

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

TESE

**EFICÁCIA DO NIM (*Azadirachta indica*) NO CONTROLE DE
ECTOPARASITOS DOS ANIMAIS DOMÉSTICOS**

JULIO ISRAEL FERNANDES

2009



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

EFICÁCIA DO NIM (*Azadirachta indica*) NO CONTROLE DE
ECTOPARASITOS DOS ANIMAIS DOMÉSTICOS

JULIO ISRAEL FERNANDES

Sob orientação do professor
Fabio Barbour Scott

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em**
Ciências Veterinárias, área de
concentração Parasitologia Veterinária

Seropédica, RJ

Agosto de 2009

636.089696

F363e

T

Fernandes, Julio Israel, 1979-

Eficácia do Nim (*Azadirachta indica*) no controle de ectoparasitos dos animais domésticos / Julio Israel Fernandes – 2009.

150 f. : il.

Orientador: Fabio Barbour Scott.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 130-150.

1. Parasitologia veterinária – Teses. 2. Parasito – Controle – Teses. 3. Nim – Teses. 4. Matéria médica vegetal - Teses. 5. Animais domésticos - Parasito – Teses. I. Scott, Fabio Barbour, 1966-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

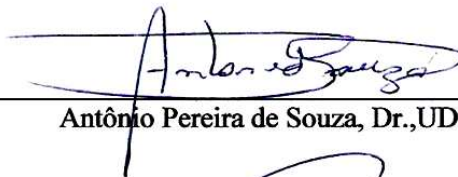
JULIO ISRAEL FERNANDES

Tese submetida ao Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, em 12 de agosto de 2009.

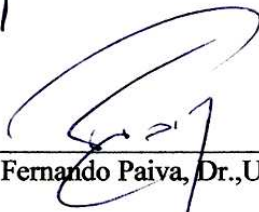
TESE APROVADA EM 12, 08, 2009



Fabio Barbour Scott, Dr., UFRRJ
(Orientador)



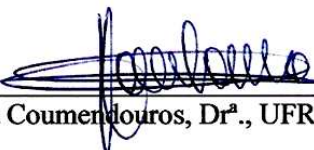
Antônio Pereira de Souza, Dr., UDESC



Fernando Paiva, Dr., UFMS



Edna Clara Tucci, Dr^a., Instituto Biológico



Katherina Coumentouros, Dr^a., UFRRJ

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por abrir as portas acadêmicas e proporcionar momentos inesquecíveis na minha vida. A Deus, pela saúde, força de vontade e conhecimento, para escolher as melhores oportunidades.

A minha mulher Luciana Gonçalves Pinto, que conheci ainda na graduação da Universidade Rural e que faz parte da minha vida, hoje e sempre, apoiando-me de maneira incondicional.

Aos meus pais, que proporcionaram a continuidade de meus estudos até o Doutorado, contribuindo para a formação de meu caráter, por me fazerem uma pessoa honesta e justa, qualidades essenciais que faltam em muitas pessoas. Ao meu irmão, por estar sempre presente nos momentos difíceis.

Ao professor Fabio Barbour Scott, ao longo dos anos, dosando de forma ímpar o papel de amigo e de orientador. Obrigado por me deixar fazer parte do Laboratório de Parasitologia Veterinária.

Ao professores Laerte Grisi pela co-orientação e auxílio durante todo o curso.

As amigas Katherina Coumendouros e Thaís Ribeiro Correia Azevedo, que me acompanham desde a graduação, sempre dispostas a contribuir com as pesquisas e atividades da tese, em particular com a colaboração das análises estatísticas. Ao amigo Guilherme pelas sugestões na correção da tese e à amiga Clarissa pelas sugestões do “abstract”.

Ao amigo Francisco de Assis Ribeiro que, de estagiário dedicado, passou a ser um grande amigo, contribuindo de forma fundamental e imprescindível para a conclusão deste trabalho.

Aos amigos Michel, Raquel, Bruno (Wally), Roberta, Felipe, Eliane, Paulinho, Cristiano e Sena-Maia pela amizade ao longo desses anos, sempre dispostos a ajudar e a me ouvir. Aos amigos do laboratório: Vanessa, Thiago, Pedro Ivan, Pedro Vianna, Suelen, Maria Clara, Clarissa, Cíntia, Lucas, Gabriela, Luciana, Thaís, Diego e outros pela ajuda na parte experimental.

Ao técnico de Laboratório, José Cláudio Andrade, pela ajuda nas pesquisas desenvolvidas desde a graduação até o final do doutorado.

À proprietária do abrigo utilizado em algumas etapas experimentais da tese, bem como aos animais que participaram do estudo, pois sem eles não seria possível concluir a pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro na modalidade de bolsista de Doutorado.

A todos os professores, funcionários e amigos do curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

BIOGRAFIA

Julio Israel Fernandes, filho de Fernando Antônio Fernandes e Regina Célia Israel, nascido em 12 de junho de 1979, no município do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro.

Ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) em agosto de 1997, diplomando-se em outubro de 2002. Foi estagiário do Laboratório de Quimioterapia experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV) do Instituto de Veterinária, desta mesma instituição, no período de março de 1999 a janeiro de 2001, e bolsista de iniciação científica do PIBIC/CNPq, no período de fevereiro de 2001 a julho de 2002. Ambas as atividades sob orientação do professor Fabio Barbour Scott.

Foi aprovado no Processo de Seleção para o Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária, do Instituto de Veterinária, em março de 2003, obtendo o grau de Mestre em Ciências Veterinárias em fevereiro de 2005.

Em 2005, foi aprovado no Processo de Seleção para o Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, nível Doutorado, do Instituto de Veterinária da UFRRJ, sob orientação do Professor Fabio Barbour Scott.

Foi aprovado em concurso público para a vaga de professor substituto da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, vinculado ao Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, exercendo o cargo no período de março de 2007 a maio de 2008.

Foi aprovado em concurso público para professor Assistente I da Universidade Federal do Pará, em maio de 2008, sendo responsável pela disciplina de Clínica Médica de Pequenos Animais, tendo entrado em exercício em junho do mesmo ano.

RESUMO

FERNANDES, J. I. **Eficácia do nim (*Azadirachta indica*) no controle dos ectoparasitos dos animais domésticos.** 2009. 150p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2009.

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a eficácia da emulsão de nim (*Azadirachta indica*) no controle dos principais ectoparasitos dos animais domésticos através de testes *in vitro* e/ou *in vivo*. Verificou-se efeito similar aos reguladores de crescimento de artrópodes, inibindo o desenvolvimento dos estágios subsequentes de *Ctenocephalides felis felis*. Efeitos adulticidas foram observados ao administrar o nim em *Otodectes cynotis*, e *Sarcoptes scabiei* var. *canis* em cães, *Notoedres cati*, em gatos e *Psoroptes ovis* em coelhos, onde o efeito dose dependente pode ser observado. O nim não apresentou eficácia no controle dos carrapatos das espécies *Amblyomma cajennense* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Altas concentrações de nim levaram a uma eficácia moderada no controle de fêmeas ingurgitadas do carrapato *R. sanguineus* em testes *in vitro*. Entretanto, os testes *in vivo* apresentaram baixa eficácia quando utilizado em altas concentrações. Já com adultos da mesma espécie, o percentual de eclosão das larvas foi o principal parâmetro a apresentar alteração. A emulsão de nim não apresentou eficácia no controle da sarna demodécica em cães, entretanto houve melhora das lesões clínicas possivelmente devido às propriedades anti-inflamatórias do fitoterápico. Embora o produto seja considerado seguro para animais domésticos, graves efeitos colaterais foram observados em todos os coelhos tratados diariamente com o produto fitoterápico, ocasionando áreas eritematosas com alopecia, máculas e pápulas. Efeitos similares foram observados em apenas um cão que demonstrou sensibilidade ao produto. Já os gatos apresentaram intensa sialorréia transitória causada pela ingestão de pequena quantidade de produto devido ao hábito de se lambar dos felinos. Nos demais animais não foram observados efeitos adversos após a aplicação do produto.

Palavras-chave: Controle; *Azadirachta indica*, Nim.

ABSTRACT

FERNANDES, J. I. **Efficacy of neem (*Azadirachta indica*) on the control of ectoparasites of domestic animals.** 2009. 150p. Thesis (Doctor in Veterinary Sciences). Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

The objective of the study was to evaluate the efficacy of the aqueous neem (*Azadirachta indica*) extract on the control of major ectoparasites of domestic animals through *in vitro* and/or *in vivo* assays. The product presented effect similar to arthropod growth regulators, inhibiting the development of subsequent stages of *Ctenocephalides felis felis* and *Musca domestica*, in which was possible to observe morphological alterations on pupae. Miticidal effects were observed on *Otodectes cynotis* and, *Sarcoptes scabiei* on dogs, *Notoedres cati* on cats and *Psoroptes ovis* on rabbits, where a dose dependent effect could be observed. Neem did not present efficacy on the control of *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks. High concentrations of neem lead to a moderate efficacy on the control of *R. sanguineus* engorged females *in vitro*. However, tests *in vivo* showed low efficacy when used at high concentrations. Already with adults of the same species, the percentage of hatch of larvae was the main parameter to submit the amendment. The neem emulsion did not showed efficacy on the control of canine demodicosis. However, a significant clinical improvement was observed, possibly due to anti-inflammatory properties of the phytotherapeutic. Despite considered safe to domestic animals, the product lead to grave side effects in all daily treated rabbits, occasioning erythematous areas with alopecia, macules and papules. Similar effects were observed in a single dog which presented sensibility to the product. Cats presented intense transitory sialorrhea caused by ingestion of small quantity of the product during self-grooming. Other animals did not showed adverse effects following product application.

Key-words: Control; *Azadirachta indica*, Neem.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Número de larvas de <i>Ctenocephalides felis felis</i> recuperadas de cães da raça Beagle, provenientes do grupo controle e tratado com uma formulação spray contendo 10% de nim.....	18
--	----

CAPÍTULO II

Tabela 1. Peso das teleóginas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> , das respectivas posturas, percentual de eclosão e índices de eficiência reprodutiva dos grupos controle e tratados nas diferentes concentrações de nim, em teste <i>in vitro</i>	30
Tabela 2. Número total e médio de teleóginas da espécie <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> coletadas dos animais por dia de experimentação, distribuídos nos diferentes grupos.....	35
Tabela 3. Peso médio do total de teleóginas da espécie <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> recuperadas dos animais em experimentação distribuídos nos diferentes grupos.....	37
Tabela 4. Peso médio dos carrapatos da espécie <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> das duas repetições e das respectivas médias contendo 10 teleóginas, coletadas dos animais em experimentação distribuídos nos diferentes grupos experimentais.....	38
Tabela 5. Peso médio das posturas das teleóginas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> nas duas repetições e das respectivas médias coletadas dos animais em experimentação distribuídos nos diferentes grupos.....	39
Tabela 6. Eclodibilidade das larvas da espécie <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> em duas repetições e das respectivas médias a partir de 10 teleóginas coletadas dos animais em experimentação distribuídos nos diferentes grupos.....	40

CAPÍTULO III

Tabela 1. Peso das fêmeas ingurgitadas, das posturas, percentual de eclosão e índices de eficiência reprodutiva do <i>Rhipicephalus sanguineus</i> nos grupos controle e tratados nas diferentes concentrações de nim.....	51
Tabela 2. Número de larvas ingurgitadas recuperadas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> em coelhos infestados artificialmente nos diferentes dias e grupos experimentais.....	54
Tabela 3. Número de larvas ingurgitadas, percentual de recuperação e ninfas não alimentadas recuperadas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> recuperadas em coelhos infestados artificialmente nos diferentes grupos experimentais.....	55
Tabela 4. Número de ninfas ingurgitadas recuperadas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> recuperadas de coelhos infestados artificialmente nos diferentes dias e grupos experimentais.....	57
Tabela 5. Número de ninfas ingurgitadas, percentual de recuperação e adultos não alimentados recuperados de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> recuperados em coelhos infestados artificialmente nos diferentes grupos experimentais.....	58
Tabela 6. Número carrapatos adultos fixados observados até o momento da coleta das teleóginas e de fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> recuperadas de coelhos infestados artificialmente nos grupos experimentais.....	60

Tabela 7. Número de fêmeas ingurgitadas recuperadas, peso médio das fêmeas ingurgitadas, peso médio das posturas e percentual de eclosão de carrapatos da espécie <i>Rhipicephalus sanguineus</i> em coelhos infestados artificialmente nos diferentes grupos experimentais.....	61
---	----

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Número de larvas ingurgitadas recuperadas de <i>Amblyomma cajennense</i> por dia experimental em coelhos infestados artificialmente nos diferentes grupos experimentais.....	71
---	----

Tabela 2. Número de larvas ingurgitadas recuperadas de <i>Amblyomma cajennense</i> em coelhos infestados artificialmente, percentual de eclosão e número de ninfas recuperadas nos diferentes grupos experimentais.....	72
--	----

Tabela 3. Número de ninfas ingurgitadas recuperadas de <i>Amblyomma cajennense</i> em coelhos infestados artificialmente, por dia, nos diferentes grupos experimentais.....	73
--	----

Tabela 4. Número de ninfas ingurgitadas recuperadas de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> recuperadas de coelhos infestados artificialmente nos diferentes dias e grupos experimentais.....	74
---	----

CAPÍTULO V

Tabela 1. Presença de <i>Psoroptes ovis</i> vivos nas orelhas direita e esquerda dos coelhos pertencentes ao grupo controle e ao tratado com a formulação em teste contendo 10% de extrato aquoso de nim, <i>Azadirachta indica</i> , antes e após o tratamento.....	83
---	----

Tabela 2. Eficácia do produto contendo 10% de extrato de Nim no controle da sarna psoróptica em coelhos naturalmente infestados.....	84
---	----

CAPÍTULO VI

Tabela 1. Resultado da otoscopia realizada nos animais naturalmente infestados com o ácaro <i>Otodectes cynotis</i> divididos em três grupos com seis animais cada.....	94
--	----

Tabela 2. Orelhas não tratadas e tratadas com extrato aquoso de nim a 10% ao fim da avaliação para infestação por <i>Otodectes cynotis</i>	95
---	----

CAPÍTULO VII

Tabela 1. Resultado dos raspados cutâneos dos cães naturalmente infestados com o ácaro <i>Sarcoptes scabiei</i> nos diferentes dias e grupos experimentais.....	104
--	-----

CAPÍTULO VIII

Tabela 1. Resultado dos raspados cutâneos dos gatos naturalmente infestados com o ácaro <i>Notoedres cati</i> nos diferentes dias e grupos experimentais.....	115
--	-----

CAPÍTULO IX

Tabela 1. Resultado dos raspados cutâneos dos cães naturalmente infestados com o ácaro <i>Demodex canis</i> nos diferentes dias e grupos experimentais.....	124
--	-----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Ambiente gramado em que os animais eram mantidos ao longo do período experimental, com casa de alvenaria onde as gaiolas eram mantidas (A). Animal da raça Beagle mantido em gaiola galvanizada por um período de 72 horas, após a infestação com 300 casais de *Ctenocephalides felis felis*..... 16
- Figura 2.** Gaiola de transporte utilizado para coleta dos ovos das pulgas, 72 horas após cada infestação, onde permaneciam por um período de quatro horas..... 16
- Figura 3.** Material coletado dos transportes de ambos os grupos após um período de quatro horas. Notar uma maior quantidade de pontos brancos (ovos de *Ctenocephalides felis felis*) no grupo controle em relação ao grupo tratado com nim..... 18
- Figura 4.** Eficácia do nim na concentração de 10%, no controle das larvas de *Ctenocephalides felis felis* em infestações artificiais realizadas em cães da raça Beagle.... 19

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Galpão onde eram mantidos os animais pertencentes ao grupo tratado com a formulação em teste contendo 1% de nim (animais à esquerda) e 5% de nim (animais à direita)..... 28
- Figura 2.** Baias individuais com estrados de madeira onde eram mantidos os animais durante todo período experimental..... 28
- Figura 3.** Eficácia carrapaticida das formulações em teste no controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em teste *in vitro*..... 31
- Figura 4.** Eficácia média das concentrações de nim a 1 e 5% no controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* durante os vinte e um dias de experimentação..... 34

CAPÍTULO III

- Figura 1.** Eficácia carrapaticida das diferentes concentrações de nim em fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* em teste *in vitro*..... 51
- Figura 2.** Eficácia carrapaticida do nim nas diferentes concentrações no controle de larvas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, em teste *in vivo*..... 53
- Figura 3.** Eficácia carrapaticida do nim nas diferentes concentrações no controle de ninfas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* em coelhos infestados artificialmente..... 56
- Figura 4.** Eficácia carrapaticida do nim nas diferentes concentrações no controle de fêmeas ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* em coelhos infestados artificialmente..... 62

CAPÍTULO V

- Figura 1.** Otite clínica no conduto auditivo esquerdo do coelho doméstico naturalmente infestado por *Psoroptes ovis*. Notar a hiperemia e a intensa formação de crostas, secundárias ao parasitismo..... 82
- Figura 2.** Otite clínica no conduto auditivo esquerdo do coelho doméstico naturalmente infestado por *Psoroptes ovis* pertencente ao grupo controle, sem tratamento, 90 dias após o início da experimentação. Notar a grave hiperemia e a acentuada formação de crostas, secundárias ao parasitismo..... 83

Figura 3. Animal pertencente ao grupo tratado, setenta e duas horas após o tratamento, apresentando reações adversas a aplicação do produto. Notar a hiperemia e alopecia iniciais.....	84
Figura 4. Animal pertencente ao grupo tratado, dez dias após o tratamento, apresentando reações adversas a aplicação do produto. Notar a intensa hiperemia e alopecia no local onde foi aplicado o produto.....	85
Figura 5. Animal pertencente ao grupo tratado, no final do período experimental, noventa dias após o tratamento, apresentando recuperação total das lesões causadas pelo nim na concentração de 10% e livre do parasitismo e da otite clínica.....	85

CAPÍTULO VII

Figura 1. Animal naturalmente infestado por <i>Sarcoptes scabiei</i> pertencente ao grupo controle no dia 0. Notar o caráter disseminado da doença.....	103
Figura 2. Animal pertencente ao grupo tratado com a formulação contendo 10% de extrato aquoso de nim tratado semanalmente. Notar as lesões dermatológicas no dia do zero (A) e no dia +63 (B).....	105
Figura 3. Animal pertencente ao grupo tratado com a formulação contendo 10% de extrato aquoso de nim tratado diariamente. Notar as lesões dermatológicas no dia do zero (A) e no dia +63 (B).....	105
Figura 4. Ambiente do abrigo onde eram mantidos os animais utilizados na experimentação.....	106

CAPÍTULO VIII

Figura 1. Animal naturalmente infestado por <i>Notoedres cati</i> utilizado no trabalho. Notar as áreas alopécicas com presença de crostas em ambas as orelhas.....	114
Figura 2. Animal infestado por <i>Notoedres cati</i> pertencente ao grupo controle no dia +60 apresentando, sintomas característicos causados pela presença do ácaro.....	116
Figura 3. Animal apresentando sialorréia logo após a utilização da formulação em teste contendo 10% de nim.....	116
Figura 4. Animal pertencente ao grupo tratado semanalmente com a formulação contendo 10% de nim no dia zero (Figura da esquerda) e no dia +60 (Figura da direita), apresentando melhora dos sinais clínicos.....	117
Figura 5. Animal pertencente ao grupo tratado diariamente com a formulação contendo 10% de nim no dia zero (Figura da esquerda) e no dia +60 (Figura da direita), apresentando melhora dos sinais clínicos.....	117

CAPÍTULO IX

Figura 1. Animal positivo para <i>Demodex canis</i> apresentando áreas alopécicas, hiperêmicas com escoriações secundárias ao prurido.....	125
Figura 2. Animal apresentando lesões dermatologias caracterizadas por pápulas e placas logo após a aplicação do produto contendo 10% de extrato de nim.....	126
Figura 3. Animal pertencente ao grupo tratado com a emulsão contendo 10% de nim, tratado semanalmente, no dia zero (A) e no dia +60 (B).....	126
Figura 4. Animal pertencente ao grupo tratado com a emulsão contendo 10% de nim, tratado diariamente, no dia zero (A) e no dia +60 (B).....	127

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 <i>Azadirachta indica</i> (Nim)	2
2.1.1 Taxonomia	2
2.1.2 Histórico e descrição	2
2.1.3 Distribuição geográfica	3
2.1.4 Farmacologia	3
2.1.5 Toxicidade	6
2.1.6 Indicações do nim	7
CAPÍTULO I	
Eficácia do nim (<i>Azadirachta indica</i>) no controle de <i>Ctenocephalides felis felis</i> (Bouché, 1835) (Siphonaptera: Pulicidae)	10
Resumo	11
Abstract	12
1 Introdução	13
2 Revisão de Literatura	14
3 Material e Métodos	15
4 Resultados e Discussão	17
CAPÍTULO II	
Eficácia do nim (<i>Azadirachta indica</i>) no controle de <i>Rhipicephalus Boophilus microplus</i> (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae)	20
Resumo	21
Abstract	22
1 Introdução	23
2 Revisão de Literatura	24
3 Material e Métodos	27
3.1 Avaliação da eficácia do nim em testes <i>in vitro</i> para <i>R. B. microplus</i>	27
3.2 Avaliação da eficácia do nim em testes <i>in vivo</i> para <i>R. B. microplus</i>	27
4 Resultados e Discussão	30
4.1 Teste <i>in vitro</i>	30
4.2 Teste <i>in vivo</i>	34
CAPÍTULO III	
Eficácia do nim (<i>Azadirachta indica</i>) no controle de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae)	42
Resumo	43
Abstract	44
1 Introdução	45
2 Revisão de Literatura	46
3 Material e Métodos	48
3.1 Avaliação da eficácia do nim em testes <i>in vitro</i> para <i>R. sanguineus</i>	48
3.2 Avaliação da eficácia do nim em testes <i>in vivo</i> para <i>R. sanguineus</i>	48
4 Resultados e Discussão	50

4.1 Teste <i>in vitro</i>	50
4.2 Teste <i>in vivo</i>	53
4.2.1 Larvas	53
4.2.2 Ninfas	56
4.2.3 Adultos	59

CAPÍTULO IV

Eficácia do nim (<i>Azadirachta indica</i>) no controle de <i>Amblyomma cajennense</i> (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae)	64
Resumo	65
Abstract	66
1 Introdução	67
2 Revisão de Literatura	68
3 Material e Métodos	70
3.1 Avaliação da eficácia do nim em testes <i>in vivo</i> para larvas de <i>A. cajennense</i>	70
4 Resultados e Discussão	71
4.1 Larvas	71
4.2 Ninfas	72

CAPÍTULO V

Eficácia do nim (<i>Azadirachta indica</i>) no controle de <i>Psoroptes ovis</i> (Hering, 1838) em coelhos	76
Resumo	77
Abstract	78
1 Introdução	79
2 Revisão de Literatura	80
3 Material e Métodos	81
4 Resultados e Discussão	82

CAPÍTULO VI

Eficácia do nim (<i>Azadirachta indica</i>) no controle de <i>Otodectes cynotis</i> (Hering, 1838) em cães	87
Resumo	88
Abstract	89
1 Introdução	90
2 Revisão de Literatura	91
3 Material e Métodos	93
4 Resultados e Discussão	94

CAPÍTULO VII

Eficácia do nim (<i>Azadirachta indica</i>) no controle de <i>Sarcoptes scabiei</i> (DeGeer, 1778) em cães	96
Resumo	97
Abstract	98
1 Introdução	99
2 Revisão de Literatura	100
3 Material e Métodos	102
4 Resultados e Discussão	103

CAPÍTULO VIII

Eficácia do nim (<i>Azadirachta indica</i>) no controle de <i>Notoedres cati</i> (Hering, 1838) (Acari:Sarcoptidae) em gatos	108
Resumo	109
Abstract	110
1 Introdução	111
2 Revisão de Literatura	112
3 Material e Métodos	113
4 Resultados e Discussão	114

CAPÍTULO IX

Eficácia do nim (<i>Azadirachta indica</i>) no controle de <i>Demodex canis</i> (Leydig, 1859) em cães	118
Resumo	119
Abstract	120
1 Introdução	121
2 Revisão de Literatura	122
3 Material e Métodos	123
4 Resultados e Discussão	124
3 CONCLUSÕES	129
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130

1 INTRODUÇÃO

O Filo Arthropoda tem uma significativa importância médica e veterinária. Muitas espécies podem causar dano diretamente ao hospedeiro ou veiculadoras de patógenos. Os animais domésticos frequentemente encontram-se parasitados por pulgas, carrapatos e ácaros causadores de sarnas que levam desde alterações de comportamento nos animais ou até mesmo a graves desordens sistêmicas, enquanto que nos animais de produção, dependendo da carga parasitária no animal, as alterações proporcionadas pelo parasitismo podem causar significativos prejuízos comerciais aos produtores.

O conhecimento da biologia do parasito a ser controlado é de fundamental importância, para implementar medidas curativas ou profiláticas. O controle mecânico, que consiste em retirar manualmente os parasitos, higienização dos animais e do ambiente, é empregado em animais de companhia com sucesso, nos casos em que há a colaboração do proprietário, aumentando a eficácia do controle químico. No caso dos animais de produção, as medidas empregadas estão frequentemente associadas ao uso de agentes químicos.

Frente ao aparecimento de artrópodes resistentes aos principais princípios ativos disponíveis no mercado, provocada pelo uso de maneira indiscriminada e de forma incorreta, associado a uma pressão cada vez maior por parte da sociedade que exige cada vez mais, drogas mais específicas, seguras, seletivas, biodegradáveis, com viabilidade econômica, baixo impacto ambiental e aplicabilidade em programas integrados de controle, novas alternativas de controle devem ser buscadas, uma vez que os custos para o desenvolvimento de uma nova droga pode exceder a 250 mil dólares.

Um país como o Brasil, com tantas peculiaridades e pluralidade climáticas e geográficas, abriga uma diversidade enorme de insetos e plantas que podem ser utilizadas no tratamento de diversas doenças (VIEGAS-JUNIOR, 2003). Extratos de plantas vêm sendo utilizados pelo homem desde a idade antiga, com mais de 2000 espécies de plantas com reconhecida propriedade inseticida. Entretanto, comercialmente, somente poucas plantas têm sido utilizadas e muitas delas restritas ao controle de pragas agrícolas.

O nim (*Azadirachta indica*) é uma árvore da família Meliaceae, sendo utilizada a mais de dois mil anos para controle de mais de quatrocentas espécies de insetos, pragas agrícolas, ácaros, nematóides, alguns fungos e bactérias, na medicina humana e animal. Utilizado ainda na fabricação de cosméticos, reflorestamento e paisagismo. O nim, em especial seu ingrediente ativo mais potente, a azadiractina, possuem diversos mecanismos de ação, dentre eles: inibição da alimentação dos insetos; afetam o desenvolvimento das larvas e atrasam seu crescimento; redução da fecundidade e fertilidade dos adultos; alteração do comportamento; causam diversas anomalias nas células e na fisiologia dos insetos e causam mortalidade de ovos, larvas e adultos, servindo ainda como um ótimo repelente natural para uso na medicina veterinária.

Por ser efetivo para muitas espécies, possuir diversos mecanismos de atuação, o que leva a minimizar os efeitos de resistência e o fato de ser muito seguro para o uso em mamíferos, diversas pesquisas tem sido realizadas atualmente com diversas partes da planta, em geral as sementes, no desenvolvimento de novos produtos acaricidas ou inseticidas.

O objetivo do trabalho foi avaliar a eficácia de uma emulsão de nim, biopesticida comercial obtido a partir da planta *Azadirachta indica* no controle dos ectoparasitos de animais de companhia e de produção.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Azadirachta indica* (Nim)

Ao longo dos anos, através de uma ciência ainda rudimentar, as diferentes civilizações que habitavam o planeta empregaram partes das plantas nas mais variadas aplicações: remédios, venenos, alimentos, bebidas e até mesmo em magias. Os primeiros relatos da utilização das plantas referem-se aos chineses e indianos e datam do ano 2.000 antes de Cristo.

Azadirachta indica é uma planta que vem sendo estudada devido as suas diferentes indicações e ao interesse por parte da indústria em sua comercialização. O nome da planta foi dado a partir dos vocábulos “Aza” que significa meio amargo em Persa e “Drakhat” que significa árvore. Quando a planta foi introduzida no Irã e para diferenciá-la da China foi incluído o termo “Hindi”, ou seja, a planta passou a ter o significado “Árvore amarga da Índia” nome atual da planta.

Na Índia é considerada uma árvore sagrada, por sua folhagem sempre verde, pela resistência de sua madeira e pelos seus benefícios profiláticos e terapêuticos, sendo referida ainda como farmácia da aldeia, pelo povo hindu (www.organeem.com.br/br/neem.asp).

Nos relatos na literatura científica é comum a associação do nome A. Juss a planta. Essa denominação é uma homenagem ao médico Antoine Jussieu, pertencente a uma família de botânicos franceses, que dedicou sua vida ao estudo das plantas e seu emprego em seres humanos.

2.1.1 Taxonomia

A árvore de onde são extraídos os princípios ativos está na ordem: Rutales, Subordem Rutineae, Família Meliaceae, Gênero *Azadirachta*, Espécie *Azadirachta indica*. Popularmente a planta é conhecida por nim. Entretanto, já foram descritos mais de 100 nomes para a mesma planta, de acordo principalmente pela distribuição geográfica, sendo os principais: Neem (Inglaterra e Estado Unidos), Nim (América Latina), Margosa (Portugal), Limba (Índia), Margousier (França), Intrans (Indonésia), Indischer ou Zedrach (Alemanha), Dogonyaro (Nigéria) e Aza Drakhart i hind (Irã) (BISWAS, 2002; MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005; SILVA, 2006).

2.1.2 Histórico e Descrição

O nim é uma planta oriunda da região do Sul da Ásia. No entanto, a exata região de origem ainda é motivo de questionamento entre os historiadores. As informações disponíveis referem-se à floresta de Karnatka (Sul da Índia), interior da floresta da antiga Birmânia (Myanmar) ou ainda na floresta da montanha Shivalik (Himalaia ocidental). Dado as características morfológicas das árvores, a teoria mais correta seria a floresta de Myanmar, porém a mais utilizada é a região ocidental da Índia.

A árvore adulta pode chegar a 20 metros de altura, tronco reto ou semi-reto de até 80 centímetros de diâmetro, relativamente curto. Seu caule é resistente com tonalidades de cor que variam de acordo com a parte da planta e sua localidade. Suas folhas são lanceoladas, compostas, grandes, de até 38 centímetros e apresentam gosto amargo.

As flores são pequenas e de simetria radial. Variam de tonalidade, do branco ao creme, com odor muito agradável, assemelhando-se ao jasmim. Dependendo do tipo de clima da

localidade a floração pode ocorrer em duas estações distintas. Nos países de clima tropical a floração ocorre o ano inteiro. O início da produção ocorre de três a cinco anos. Atingindo pico de produção em 10 anos (HOWATT, 1994).

Os frutos são lisos, glabros, elipsóides que lembram uma azeitona, com coloração e tamanho bem semelhante. No Brasil ocorre produção de frutos nos meses de julho e setembro, podendo ocorrer novamente entre novembro e janeiro (SILVA, 2006).

Suas propriedades medicinais foram primeiramente observadas pelo professor alemão Heinrich Schmetterer da Universidade de Giessen, no Estado de Hessen, na Alemanha. Em uma visita realizada à Índia, o mesmo observou que uma nuvem de gafanhotos durante o processo de migração destruiu todas as plantações que encontravam, mas as árvores do nim permaneciam intactas.

De acordo com Ermel (1986), o conhecimento das partes da planta, tipo de solo, temperatura, umidade, momento da coleta e época do ano, influenciam nas concentrações dos diversos princípios ativos presentes na planta.

2.1.3 Distribuição Geográfica

O nim é caracterizado por sua rusticidade e adaptação aos diferentes tipos de clima e solo. Essas características fizeram da planta de origem indiana se disseminar por diversos países e continentes, incluindo a África, Américas do Norte, Central e do Sul; Ilhas do Pacífico e Austrália. O nim é facilmente propagado, podendo ser plantado por meio de sementes, mudas, árvores novas e brotos de raiz (MOSSIN; KEMMELMEIER, 2005). Entretanto, o melhor desenvolvimento da planta se dá a uma temperatura de 20 °C, chuvas anuais de 800 - 1800 mm, solos arenosos, profundos e bem drenados, e com pH entre 6,5 e 7,5 (MARTINEZ, 2002).

A chegada da planta ao Brasil foi possível a partir de instituições de pesquisa como Instituto Oswaldo Cruz (1982), Instituto Agrônomo de Campinas e Instituto Agrônomo do Paraná (1996). Hoje diversas instituições cultivam a planta com objetivos semelhantes: produção de madeiras de qualidade e também para a produção de folhas e frutos, de onde se retira a matéria prima para produtos inseticidas, para uso medicinal ou na indústria de cosméticos (MARTINEZ, 2002).

2.1.4 Farmacologia

A planta *A. indica* é uma das mais estudadas devido a suas propriedades químicas (COLLINS, 2006). Muitos trabalhos foram e estão sendo desenvolvidos para detectar os princípios ativos no nim.

Nas últimas cinco décadas, com o advento de novas metodologias químicas como o uso das técnicas de cromatografia e de análises espectrofotométricas, muitos compostos foram identificados recentemente, sendo fonte de desenvolvimento de medicamentos contra diversas doenças e controle de pragas (BISWAS, 2002).

Diversas formulações químicas vêm sendo utilizadas para a obtenção de produtos a base de nim. Os extratos são preparações concentradas de substâncias vegetais ou animais obtidos pela remoção dos constituintes ativos das respectivas substâncias com solventes apropriados, evaporando-os totalmente ou quase totalmente em banho-maria, estufa ou ar quente. Já as suspensões são sistemas heterogêneos em que a fase externa (contínua) é líquida ou semi-sólida e fase interna (dispersa) é constituída por partículas sólidas insolúveis no meio utilizado.

O termo emulsão deriva do verbo latino *enulgeo* que significa mungir, sendo aplicado em todas as preparações com características de um sistema disperso de duas fases líquidas. Segundo a Farmacopéia Brasileira, o termo emulsão significa preparações farmacêuticas obtidas pela dispersão de duas fases líquidas imiscíveis ou praticamente imiscíveis. Os tensoativos, agente emulsificante, frequentemente está associado às emulsões por desencadearem uma diminuição da tensão superficial entre dois líquidos, aumentando ainda a estabilidade da emulsão.

O nim, como inseticida botânico, apresenta a vantagem de ser biodegradável, fotossensível, seguro e de custo relativamente pequeno. Outra vantagem, é o fato da planta ser auto-sustentável, pois embora os princípios ativos sejam encontrados em diversas partes da planta, a maior concentração encontra-se nas sementes, não havendo a necessidade da derrubada das mesmas para a produção de óleos ou extratos (MARTINEZ, 2002; MACEDO, 2007; SILVA et al., 2007). Diferentes trabalhos relatam as variações de eficácia da mesma planta dependendo do local de onde foi isolado os princípios ativos.

Mais de 100 compostos já foram isolados, sendo classificados atualmente em dois grandes grupos: os primeiros são os isoprenóides, representados pelos diterpenóides e triterpenóides. Dentro dessa classe encontram-se os triterpenos, mais especificamente os limonóides, encontrados nas plantas da família Meliaceae, cuja característica é a presença de triterpenos oxigenados, conhecidos como meliacinas, na estrutura química da molécula. A outra classe de produtos isolados é constituída por diversas moléculas classificadas em compostos fenólicos, esteróides, proteínas, carotenóides, carboidratos, flavonóides, cetonas e curaminas.

Através de diferentes processos podem ser extraídos diversos compostos: neemola, margosina, ácido palmítico, ácido oléico, ácido ttradecóico, nimbosterol, nimbicetim, sesquiterpenos, solanina, solanol, solanoacetato, diacetil nimbidin, dentre outros. Porém, apenas um seletivo grupo de moléculas apresenta atividade biológica no controle de pragas, como a azadiractina, salanina, nimbinina e nimbinina (SCHMUTTERER, 1990; LNO et al., 1999; SANTOS; ANDRADE, 2000; ABDEL-SHAFY; ZAYED, 2002; MENEZES, 2005; MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005; MACEDO, 2007; SILVA et al., 2007).

A azadiractina é considerada um dos mais potentes limonóides presentes no nim. É um composto solúvel em água com álcool, muito sensível aos raios ultravioletas e aos meios extremamente ácidos ou básicos. Já foram descritos diversos isômeros da azadiractina, classificados de A-I, sendo a azadiractina A, a de maior prevalência. É encontrado em maior concentração nos frutos, onde atinge o pico de concentração no momento do seu amadurecimento, mas pode sofrer alterações a fatores extrínsecos tais como colheita, armazenamento, presença de luz, umidade e variações de pH (MORDUE ; BLACKWELL, 1993).

Têm sido demonstrados estudos têm demonstrado os diversos mecanismos de ação do nim. O primeiro a ser identificado foi à repelência; os insetos não se aproximam dos locais onde foi empregado o produto. Isso devido à presença de quimiorreceptores nos tarsos de algumas espécies de insetos, que são capazes de detectar a presença da azadiractina, o que pode, portanto, atuar tanto na redução de alimentação quanto na de postura (MARTINEZ, 2002; BUSS; PARK-BROWN, 2006).

O efeito denominado *anti-feeding* também é bem documentado, devido à inibição dos receptores localizados na boca do artrópode, tornado o alimento não palatável e sua ingestão leva a quadros de supressão de apetite e posteriormente a morte (BLANEY; SIMMONDS, 1990; SINGH, 2003; SU; MULLA, 1998A), sendo esse efeito observado por até duas

semanas após sua aplicação (SCHMUTTERER, 1990). É incriminado ainda por reduzir a eficiência de conversão alimentar através das alterações em enzimas do mesentério.

O nim pode ainda interferir nos hábitos reprodutivos de machos e fêmeas, retardando a maturidade sexual, início do acasalamento, período de postura, diminuição na produção de ovos, na eclosão de larvas e viabilidade dos estágios imaturos. Tais efeitos nas fêmeas podem estar relacionados ao aumento do tempo necessário para o desenvolvimento dos oócitos. Em machos, a hipótese mais aceita é que o nim afeta a espermatogênese, diminuindo a fecundidade das fêmeas, podendo ainda inibir a cópula quando empregado em altas concentrações (ISMAN, 1997; COOPING; MENN, 2000; MARTINEZ, 2002; STEFFENS; SCHMUTTERER, 1982; SU; MULLA, 1998b).

Eles podem ainda ser classificados como inibidor de desenvolvimento de insetos, através de sua interferência no sistema neuroendócrino de insetos que se manifesta por uma desordem hormonal em diferentes etapas do processo de crescimento, afetando os hormônios da ecdise (ecdisona e 20-hidroxi-ecdisona), o hormônio juvenil, produzido respectivamente, nas glândulas protorácicas e nos *corpora allata*, mediante estimulação por hormônios e a secreção de proteínas (MARTINEZ, 2002; MENEZES, 2005). O modo de ação da azadiractina consiste em alterar os teores da ecdisona e de outros hormônios ecdisteróides na hemolinfa, possivelmente por interferir na síntese e liberação do hormônio protoracicotrópico (PTTH) do *corpora allata*, o qual estimula a produção de ecdise pelas glândulas protorácicas, sendo assim, o nim interfere no funcionamento das glândulas endócrinas que controlam a metamorfose do inseto, impedindo assim o desenvolvimento na fase larval, se comportando como análogo do hormônio juvenil (VIEGAS-JÚNIOR, 2003; ISMAN, 1997, COOPING; MENN, 2000).

Outros efeitos causados em alguns insetos são relatados por diversos pesquisadores e incluem interferência nas funções bioquímicas e fisiológicas (MARTINEZ, 2002; GOVINDACHARI, et al., 2000; MARTINEZ; VAN EMDEN, 2001; CARPINELLA et al., 2003), atuam na inibição da síntese de quitina causando a morte por desidratação (SCHMUTTERER, 1990; SILVA, 2006) e podem ainda atuar de forma direta devido a seus efeitos citotóxicos, causando alteração na locomoção e até mesmo a comunicação dos insetos (MOSSIN; KEMMELMEIER, 2005).

As alterações provocadas pelo nim são diferentes em cada artrópode. Duas características importantes que frequentemente são relatadas pelos autores residem no fato dos estágios imaturos dos artrópodes serem mais suscetíveis do que os adultos e o efeito dos extratos de nim serem dose dependente (MORDUE; BLACKWELL, 1993; SIRIWATTANARUNGSEE et al., 2008). De modo geral, nas concentrações mais baixas, os insetos frequentemente tiveram alterações no desenvolvimento, enquanto nas concentrações mais altas, pode haver total inibição de alimentação (WARTHEN, 1989). Em estudos *in vitro* onde maiores concentrações podem ser empregadas, alguns artrópodes morreram após o contato com o produto, possivelmente devido a seu efeito tóxico estar mais disponível.

Em altas infestações ou em situações que haja necessidade do controle imediato do artrópode, o uso do nim fica em segundo plano, uma vez que diferentemente da maioria dos produtos sintéticos, o nim não possui efeito *knock-down*, ou seja, não é capaz de matar o artrópode logo após o contato com o produto. Pesquisas estão sendo desenvolvidas para avaliar uma possível redução no uso de substâncias químicas quando empregado o nim (SILVA, 2006).

Outros compostos frequentemente extraídos em uma concentração muito pequena são a nimbina e salanina que são caracterizados pelos seus efeitos repelentes e *anti-feeding* nos insetos.

2.1.5 Toxicidade

Uma das principais razões para seu uso, é o fato de que em concentrações terapêuticas não apresentar toxicidade em mamíferos. Observações em morcegos, pássaros e caprinos que ingerem diferentes partes da planta não demonstraram nenhum sinal de intoxicação. Testes avaliando irritação ocular, cutânea, resposta imune, inalação e sensibilidade ao nim não apresentaram alterações que causassem preocupação do ponto de vista toxicológico.

As populações do continente africano costumam consumir as folhas do nim no preparo de chás sem relatos de intoxicação. No Brasil, algumas pessoas têm por hábito misturar as folhas secas moídas, integradas à erva-mate no preparo do chimarrão sem demonstrar quaisquer sinais de intoxicação. Silva (2006) relatou o uso, por populações em assentamentos, das folhas do nim para o tratamento de cefaléia crônica e como adjuvante no tratamento de herpes labial ao administrar juntamente com a aguardente. Quando administrado por via oral em humanos, o nim causou apenas diurese, este sintoma também fora observado em cães quando administrado por via intravenosa.

Benavides et al. (2001) para demonstrarem a segurança de um produto contendo 4% de extrato nim, realizaram teste de segurança em coelhos domésticos administrando a solução em teste através de banhos, inoculação dérmica e instilando no globo ocular dos animais domésticos, onde nenhuma reação adversa foi notada.

Testes envolvendo a segurança do nim são amplamente utilizados em ratos, seja administrando por via oral, intramuscular, intraperitoneal ou ainda intravenosa, com raros relatos de intoxicação. Os ratos foram observados por longos períodos, inclusive gerações subsequentes, onde nenhum parâmetro foi anormal (RAIZADA et al., 2001; RAJI, et al., 2004). Entretanto, Qadri et al. (1984) relataram reações cutâneas adversas causadas pelo uso de óleo de nim na concentração de 30% em ratos, traduzidas através de descamação e hiperqueratose.

Intoxicação aguda e subaguda foi relatada por Mahboob et al. (1995) em ratos. O estudo revelou sinais de alterações enzimáticas em diversos tecidos que dependendo da dosagem empregada passavam por alterações não dignas de nota ou por sintomatologia aguda que era reversível após a suspensão do óleo. Alterações microscópicas nos rins e no fígado foram relatadas por Srimannarayana (1993) após a utilização do óleo de nim por oito dias consecutivos em ratos.

Apesar de muito seguro para os mamíferos, Ahmed e Grainge (1986) e Biswas et al. (2002) descreveram que alguns extratos de nim foram tóxicos para coelhos e porquinhos da Índia. Dentre os diversos compostos isolados a partir das diferentes partes da planta, o nimbolida e epoxiazadiradiona são os compostos tóxicos isolados das diversas partes das plantas, sendo a nimbolida o agente responsável pelos quadros de intoxicação (COHEN et al., 1996).

Embora seja considerado muito seguro em animais de sangue quente, há relatos de intoxicação em humanos, sobretudo ao utilizarem o óleo de nim. Os principais sintomas de intoxicação foram descritos primariamente por Nadkarni (1954) relatando quadro de tonturas, falta de clareza de visão, confusão mental, estupor e pupilas dilatadas, atuando também como um irritante gastrointestinal produzindo vômitos e diarreia. Já Gandhi et al. (1988) relataram quadro de intoxicação nos animais após a utilização de altas doses causando alterações na marcha e desconforto respiratório.

Redução do peso, fraqueza, inapetência, depressão, bradicardia e até mesmo a morte foram reações adversas observadas em caprinos tratados com folhas ou suspensão aquosa de nim (ALI, 1987).

Khan e Awasth (2003) constataram uma diminuição no número de espermatozoides e um aumento nas alterações morfológicas. Associado a esse achado, os pesquisadores retratam a presença da sequência (-O-CH=) na estrutura da molécula como ocorre em muitos carcinogênicos, não descartam possíveis alterações genéticas em humanos a longo tempo.

As alterações relatadas por todos os pesquisadores reforçam o papel do óleo como possível agente da intoxicação, apontando como possíveis causas a inibição de algumas enzimas, na interação de algumas moléculas com seus receptores e alterando a permeabilidade e integridade da membrana (NAT et al., 1991).

2.2 Indicações do Nim

Os primeiros relatos de sua utilização restringem-se a produção de sombra para animais e humanos. Por possuir madeira de boa qualidade, é utilizada na construção civil, em batentes e na fabricação de móveis. É utilizada ainda na indústria de cosmética, no preparo de sabões e creme dentais. Por ser considerada uma espécie robusta, é empregada no reflorestamento em áreas degradadas da região árida e costeira do Brasil (SILVA, 2006; FARIAS 2008).

A eficácia terapêutica de nim já é conhecida para o homem desde a Antiguidade como resultado de constante experimentação com a natureza. A planta já foi descrita por apresentar atividade anti-inflamatória, antipirético, anti-helmíntica, antiviral, antifúngica, anti-séptico, cicatrizante, diurético, laxativo, calmante, indução do estro, imunomodulador, podendo ainda ser empregado no tratamento de hepatite, lepra, doenças oculares, dores de cabeça, reumatismo e úlceras (AHMED; GRAINGE, 1986; LANS et al., 2000; BISWAS, et al., 2002; BANDYOPADHYAY et al., 2004; PARK-BROWN; BUSS, 2006), diabetes (CHATTOPADHYAY, 1997; BISWAS, 2002); auxiliar no tratamento periodontal (PAI, et al., 2004); anti-fertilidade através de ação espermicida (KAUSHIC; UPADHYAY, 1995; GARG et al., 1998; KHILLARE; SHRIVASTAV, 2003); ação abortiva através de reações imunocelulares (MOSSINI; KEMMELMEIER, 2006) e anti-neoplásica (AHMED; GRAINGE, 1986; BALASENTHIL et al., 1999; DASGUPTA et al., 2004; KUMAR et al., 2006).

Outra indicação do nim foi feita através dos trabalhos de Isah et al. (2003) onde avaliaram as propriedades antimalárica do nim obtido da casca e das folhas administrado em ratos infectados por *Plasmodium falciparum*. Já Soh e Benoit-Vical (2007) relataram o sucesso do uso no tratamento de *P. falciparum* em testes *in vitro* devido a sua ação citotóxica. Entretanto, ao empregar o tratamento em ratos infectados, os resultados foram frustrantes, sendo a hipótese mais aceita a não metabolização de maneira correta da planta por parte dos ratos.

Já foi descrita também no controle de mais de 430 pragas tais como: moscas, lagartas, traças, gafanhoto, besouros, baratas, formigas, percevejos, caramujos, entre outros. (WARTHEN, 1989; MORDUE; BLACKWELL, 1993; MARTINEZ, 2002; MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005), causando múltiplos efeitos, tais como repelência, redução da fertilidade, alterações de comportamento e da fisiologia do inseto que acabam por causar a morte do artrópode (FARIAS, 2008).

Devido a sua ação no controle do barbeiro *Rhodnius prolixus*, o composto azadiractina se mostrou eficaz na inibição de *Trypanosoma cruzi* agente causal da Doença de Chagas (MARTINEZ, 2002). Seu uso em mosquitos também é relatado em diversos trabalhos. A capacidade de repelência da azadiractina foi comprovada nos gêneros *Culex* e *Anopheles* (DUA et al., 1995). Há relatos de Rahman et al. (2001) onde observaram efeito larvicida da azadiractina na espécie de mosquito *Culex quinquefasciatus*.

Em 1984, Zebitz utilizou extrato aquoso de nim no controle de *Aedes aegypti* relatando alterações morfológicas nos mosquitos adultos e mortalidade dos estágios evolutivos intermediários. Pereira et al. (2008) também estudaram a atividade do extrato botânico do nim contra ovos, larvas e adultos do mosquito *A. aegypti*, com eficácia de 98% no controle das larvas. Já Kondo et al. (2004) relataram a eficácia do extrato de nim na concentração de 1000 ppm no controle de larvas de quarto estágio de *Aedes albopictus* através de testes de imersão.

Uma das limitações quanto ao emprego do nim de forma comercial, está na durabilidade do produto. A atividade dos compostos reduz significativamente a partir do quarto dia de aplicação, causado pela ação de luz ultravioleta, tendo a necessidade de diversas aplicações (VERKERK; WRIGHT 1993).

Alguns trabalhos relataram o uso do nim como cicatrizante e suplemento alimentar (ANADAM et al., 1996; RAO, et al., 2003). O nim já foi utilizado em bovinos mantidos em áreas alagadiças para auxiliar na cicatrização de feridas do casco. Através da observação clínica associado ao exame histopatológico, o processo de cicatrização na pele foi considerado mais efetivo nos animais em que foi aplicado óleo de nim, segundo Anil Kumar et al. (1993) em búfalos e Purohit e Chauhan, 1992, em camelos.

Vijayan et al. (1987) aplicaram com sucesso óleo de nim por via intra-mamária durante sete dias no tratamento de mastites. Também já foi relatada sua indicação como contraceptivo, uma vez que possui atividade espermicida (YAO, 1993). Segundo Silva, (2006) algumas pesquisas vêm sendo desenvolvidas na utilização do Nim para o controle de ratos e camundongos.

A principal indicação do nim é auxiliar no controle dos parasitos dos animais domésticos e de produção. Em uma recente revisão sobre a utilização do nim no Paquistão, Farooq et al., (2008) mencionam atividade contra piolhos, larvas de moscas e como anti-helmíntico.

Costa et al. (2006) utilizaram folhas de nim em quarenta ovinos com idades entre seis e doze meses, naturalmente infectados por helmintos. As folhas secas da planta eram administradas diariamente na dose de 0,1 g / kg ou 0,2 g / kg, dependendo do grupo do animal. Eram realizadas técnicas de exame de fezes para o controle do experimento através da contagem de ovos por grama de fezes. Durante os noventa dias de experimentação foram achados nos exames e confirmados posteriormente com necropsia dos animais helmintos das espécies *Haemonchus contortus* e *Cooperia curticei*. Não houve diferença significativa entre o grupo controle e os dois grupos tratados com folhas de nim, sendo assim, os autores relataram que as folhas administradas por via oral não são eficazes no controle das parasitoses gastrointestinais de ovinos.

Em 2008, Costa et al. empregaram extratos de nim em cinco concentrações: 0.19, 0.78, 3.12, 12.5 e 50.0 mg/ml. No controle de *H. contortus*. Na concentração de 50 mg/ml, quando o solvente utilizado foi o acetato de etila, a queda observada na postura foi de 51,31% e a inibição do desenvolvimento larval foi de 68,10%. Ao utilizarem o etanol, a eficácia na inibição da postura foi de 99,77% na concentração de 3,12 mg / ml e desenvolvimento das

larvas de 87,11% na concentração de 50 mg/ml. Os resultados demonstraram a eficácia do tratamento *in vitro*, sendo necessários novos estudos utilizando metodologias *in vivo*.

Das et al. (1993) ao empregarem uma associação de *Cedrus deodara*, *A. indica* e *Embelia ribes* relatam a eficácia de 100% no controle de piolhos de frangos, *Menopon gallinae* e *Lipeurus caponis*. Heath et al. (1995) empregaram o nim no controle de *Bovicola ovis* encontrando resultados superiores quando comparados ao uso de outras substâncias sintéticas por pelo menos 40 dias.

Os extratos de nim já foram utilizados no controle do ácaro hematófago de galinhas *Dermanyssus gallinae*, que também podem parasitar outras aves domésticas e silvestres. Em 2005, Lundh et al. relatam eficácia de 92% ao utilizarem em testes *in vitro*, extratos de Nim na concentração de 20% no controle do ácaro. Soares et al. (2008) relatam a eficácia do extrato de nim a 2% após quatro aplicações com intervalo de sete dias no controle de *Ornithonyssus sylviarum* em poedeiras comerciais naturalmente infestadas.

CAPÍTULO I

EFICÁCIA DO NIM (*Azadirachta indica*) NO CONTROLE DE *Ctenocephalides felis felis* (BOUCHÉ, 1835) (SIPHONAPTERA: PULICIDAE)

RESUMO

Ctenocephalides felis felis, vulgarmente conhecida como pulga do gato, é o ectoparasito de maior prevalência em cães e gatos. Sua importância vai desde o simples desconforto acarretado pela sua presença, até a manifestação de dermatites alérgicas à saliva deste parasito, além do papel desempenhada como hospedeira intermediária de helmintos, transmissão de bactérias, vírus e outros agentes patogênicos para os animais de companhia e para os seres humanos. O controle é feito utilizando-se produtos químicos no ambiente e nos animais, podendo causar efeitos adversos. A busca por novas moléculas, mais seguras, mais específicas e ecologicamente corretas é uma realidade. O presente estudo foi realizado com objetivo de avaliar a eficácia de uma emulsão contendo 10% de nim (*Azadirachta indica*) no controle da pulga *C. felis felis*. Foram utilizados dois cães da raça Beagle, mantidos em gaiolas individuais sem contato prévio com inseticidas. Cada animal foi infestado com 300 pulgas macho e 300 fêmeas, perfazendo um total de 600 pulgas, em cada dia de desafio, nos dias +4, +7, +14, +21, +28, +35 e +42. Setenta e duas horas após a infestação, estes animais foram mantidos em transporte próprio por um período de quatro horas, para a coleta dos ovos. Após sete dias os ovos que foram colocados em tubos de ensaio com ração para pulgas eram fixados em álcool e posteriormente avaliados quanto à taxa de eclosão. O número de larvas recuperadas do grupo tratado foi menor em relação ao grupo controle. A eficácia calculada a partir da coleta dos ovos, nos dias +4, +7, +14, +21, +28, +35, +42 foi de 95,78; 91,75; 82,2; 28,91; 100; 47,5 e 26,15% respectivamente, com eficácia média de 67,7%, ao longo de todo o período experimental. Pode-se afirmar que o uso de nim é uma alternativa eficaz no controle das pulgas da espécie *C. felis felis*.

Palavras-chave: *Ctenocephalides felis*; Pulga; Controle; Nim; Biopesticida

ABSTRACT

Ctenocephalides felis felis, known as the cat flea, is the ectoparasite of higher prevalence in dogs and cats. Its importance goes from the discomfort caused by its presence to the flea bite allergic dermatitis, besides its role as intermediate host or vector of helminths, bacteria, viruses and other pathogenic agents to companion animals and human beings. Control is done by using chemical products on animals and environment, causing adverse effects. The search for new, safer, more specific and environmentally safe molecules is a reality. The objective of the present study was to evaluate the efficacy of a 10% neem (*Azadirachta indica*) emulsion in the control of *C. felis felis*. Two Beagle dogs free of contact with insecticides were utilized, placed in individual cages. Each one was infested with 300 male and 300 female fleas, totalling 600 specimens, on days +4, +7, +14, +21, +28, +35 and +42. Seventy-two hours following infestation, animals were kept in pet transport boxes for a 4h period in Eggs were collected and placed in test tubes. Seven days, the material from the test tubes were fixed in ethanol and evaluated for hatching rate. The number of larvae recovered from treated group was substantially lower when compared to the control. The efficacy based on egg collection was 95.78; 91.75; 82.2; 28.91; 100; 47.5 and 26.15% on days +4, +7, +14, +21, +28, +35, and +42, respectively. A 67.7% mean efficacy was reached throughout the experimental period. It can be concluded that neem emulsion is an efficacious option on the control of *C. felis felis*.

Keywords: *Ctenocephalides felis*; Fleas; Control; Neem; Biopesticide

1 INTRODUÇÃO

As pulgas são insetos ápteros, holometabólicos, de coloração castanha, de corpo comprimido lateralmente e que medem de 1 a 8 milímetros. Com quase 3000 espécies descritas, a espécie vulgarmente conhecida como pulga do gato, *Ctenocephalides felis felis*, é a de maior prevalência em cães e gatos. Os adultos de ambos os sexos exercem a hematofagia, podendo ser realizada durante o dia ou à noite, com duração de 10 minutos, ingerindo aproximadamente 14µl de sangue, o que corresponde a 15 vezes o seu peso, levando a danos decorrentes da injúria provocada pela picada e espoliação sanguínea durante a alimentação, dermatites alérgicas em virtude da inoculação de antígenos presentes na saliva da pulga (MEHLHORM et al., 2001; FOIL et al., 1998; LINARDI; GUIMARÃES, 2000) representando 50% das causas de alergias em cães e gatos (LINARDI, 2004).

Seu ciclo biológico está dividido em duas fases: uma fase de vida parasitária, sobre o hospedeiro, e outra de vida livre, no ambiente. Nos hospedeiros são encontradas as formas adultas, machos e fêmeas, que são estritamente hematófagas, e no ambiente são encontradas as formas imaturas, ou seja, os ovos, as larvas, as pré-pupas e as pupas, além de adultos recém emergidos dos pupários (COREIA, 2007). O ciclo tem duração média de 25 a 30 dias (LINARDI, 2004) e está diretamente relacionado às condições ambientais, sendo influenciado principalmente pela temperatura e umidade, podendo levar até 15 dias (SANTOS, 2000). No ambiente encontramos 95% dos indivíduos da população de pulgas, enquanto apenas 5% estão no hospedeiro (LINARDI; GUIMARÃES, 2000).

As pulgas também são hospedeiros intermediários do cestoda *Dipylidium caninum* e do filarídeo *Dipetalonema reconditum* além de serem transmissores de diversos patógenos entre eles *Bartonella henselae* (RUGG et al., 2007) e *Mycoplasma* spp (ALMOSNY, 2002), de *Rickettsia typhi*, agente causador do tifo murino (WILLAMS et al., 1992), e de *Rickettsia felis*, agente causador da riquetsiose felina (WEDINCAMP; FOIL, 2002), podendo ainda ser vetores do vírus da leucemia felina (VOBIS et al., 2005).

De forma geral, o controle de pragas pode ser realizado de duas formas: o controle mecânico e o controle químico. A limpeza do ambiente, a catação manual de parasitos e a higienização do animal são alternativas eficazes no controle de ectoparasitos. O emprego de medidas de controle mecânico, juntamente com o controle químico, no qual se faz o uso de inseticidas e reguladores de crescimento de artrópodes, favorece um controle estratégico deste ectoparasito (DRYDEN et al., 1989).

O desenvolvimento e aplicação de medidas alternativas de controle visam reduzir o uso intenso e indiscriminado de produtos químicos, que atualmente predomina como prática, acarretando prejuízos dentre os quais: poluição do meio ambiente, desenvolvimento de cepas resistentes, além de custos elevados aliados a resultados ineficazes tornando desfavorável a relação custo benefício.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia do nim no controle de *Ctenocephalides felis felis* em cães infestados artificialmente, avaliando a interferência do nim no processo de eclosão dos ovos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Inseticidas de vários grupamentos químicos podem ser empregados no controle dos principais ectoparasitos de cães e gatos. Dentre eles, destacam-se: organofosforados, formamidas, piretróides, lactonas macrocíclicas, nitroguanidinas e fenilpirazoles, em diversos tipos de formulações e métodos de aplicação como sabonetes, xampus, pós molháveis, concentrados emulsionáveis, talcos, spray, colares impregnados, “spot-on”, “strip-on”, “pour-on” (SCOTT et al., 2002).

De acordo com a literatura, o uso de pulicidas no controle de *C. felis felis* apresentam eficácias variadas. O controle químico pode desencadear problemas de resistência e resíduos no meio ambiente e nos animais. A vulnerabilidade dos produtos químicos diante da capacidade de sobrevivência dos parasitos faz com que eles tenham tempo de uso pré-determinado. Muitas pesquisas estão sendo realizadas a partir da utilização de biopesticidas que tenham a capacidade de interferir nos processos biológicos dos parasitos, como a planta *A. indica*.

Os extratos de nim já foram utilizados no controle de pulgas. Kilonzo (1991) empregou óleo de nim a 50% obtidos a partir de sementes no controle de pulgas das espécies *C. felis* e *Xenopsylla brasiliensis* em testes *in vitro*. As larvas de quarto estágio das pulgas eram colocadas em placas de Petri contendo o extrato da planta, onde eram realizadas observações com 30 minutos, 1, 2, 4, 8, 12 e 24 horas para avaliar a mortalidade das mesmas. Após 24 horas, o percentual de larvas mortas das espécies *C. felis* e *X. brasiliensis*, foi de 95,3 e 94,7% respectivamente.

Guerrini e Kriticos (1998) utilizaram o nim no controle de *C. felis* em cães e gatos e confirmaram os dados relatados por Jones et al (1994) e Schmutterer (1990), que não observaram o efeito adulticida em insetos. No entanto, observaram que houve redução no número de pulgas nos animais, uma vez que o extrato possuía ação repelente dose-dependente sobre as pulgas.

Kilonzo et al. (2001) realizaram um experimento com 20 caprinos infestados por pulgas divididos em dois grupos de dez animais cada: sendo o primeiro mantido sem tratamento e o segundo pulverizado com extratos de nim. Os autores observaram uma acentuada queda na carga parasitária dos animais tratados do dia +7 até o dia +84 principalmente devido à soma dos efeitos adulticida e repelente do extrato de nim.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas pulgas provenientes da colônia mantidas nas dependências do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV). Para avaliar a atividade do nim na concentração de 10%, aplicados com auxílio de um borrifador, foram utilizados dois cães da raça Beagle oriundos do Canil de Experimentação, localizado nas mesmas dependências do laboratório.

Foi utilizada a emulsão de nim, a partir do óleo de nim puro, adquirido do laboratório Natural Rural®. Para o preparo da emulsão foi acrescentado a uma parte do óleo, tween 80 (emulsificante) na concentração de 30%. Posteriormente, a solução foi levada a um agitador magnético com aquecimento, onde permanecia por 10 minutos a uma temperatura de 40° C, completando até a quantidade desejada com água.

No dia 0, o animal do grupo tratado com a formulação em teste recebeu três borrifadas por quilograma de peso vivo, distribuídas por todo o corpo, enquanto o grupo controle foi borrifado com solução fisiológica. Os cães foram mantidos com água e comida *ad libitum*, em canis distintos, gramados, de forma que os animais em experimentação não tivessem contato durante todo o período experimental, inclusive, com outros animais.

No momento das infestações e por um período de 72 horas, os animais foram alocados separadamente em gaiolas de ferro galvanizado medindo 120 x 60 x 60 cm. Estas gaiolas foram mantidas em instalações de alvenaria dentro do canil (Figura 1). Cada animal foi infestado com 300 pulgas machos e 300 fêmeas, perfazendo um total de 600 pulgas, em cada dia experimental, realizado nos dias +4, +7, +14, +21, +28, +35 e +42.

Após esse período, os animais de ambos os grupos foram mantidos em gaiolas de transporte, medindo 80x60x60 cm, um para cada animal devidamente identificado, por um período de quatro horas (Figura 2). Após este período, os animais ainda dentro dos transportes foram escovados com o intuito de se retirar ovos de pulgas que possam estar aderidos no pelame do animal. Após a escovação, os animais foram retirados das gaiolas de transporte, e o material presente no piso do transporte foi coletado com o auxílio de um pincel de cerdas macias, varrendo-se toda a área interna.

Os ovos de pulga, obtidos no material coletado, devidamente identificado, quantificados e separados em seis repetições contendo 10 ovos cada, foram acondicionados em tubos de ensaio com o auxílio de um aspirador de baixa potência ao qual foi adaptado um tubo de borracha e uma pipeta Pasteur. Este procedimento foi realizado com auxílio de um microscópio estereoscópico. Juntamente aos ovos foi adicionado meio grama de uma dieta necessária para manutenção das larvas, preparada com uma parte de farelo de trigo e uma parte de sangue bovino desidratado em estufa na temperatura de 100 °C durante 24 horas, misturada com areia na proporção de 1:5 (CORREIA et al., 2003). Posteriormente, estes ovos foram incubados em uma câmara climatizada mantida na temperatura de 28 ± 1°C e UR de 75 ± 10%. Ao final de sete dias, o material presente nos tubos foram vertidos em álcool 70° e examinados ao microscópio estereoscópico para avaliar o percentual de emergência das larvas.

A atividade do extrato aquoso contendo nim a 10% foi avaliada com base no cálculo da eficácia empregando-se a seguinte fórmula: [(percentual de eclosão de larvas dos ovos provenientes do grupo controle - percentual de eclosão de larvas dos ovos provenientes do grupo tratado) / (percentual de eclosão de larvas dos ovos provenientes do grupo controle)] x 100 (ABBOTT, 1925).

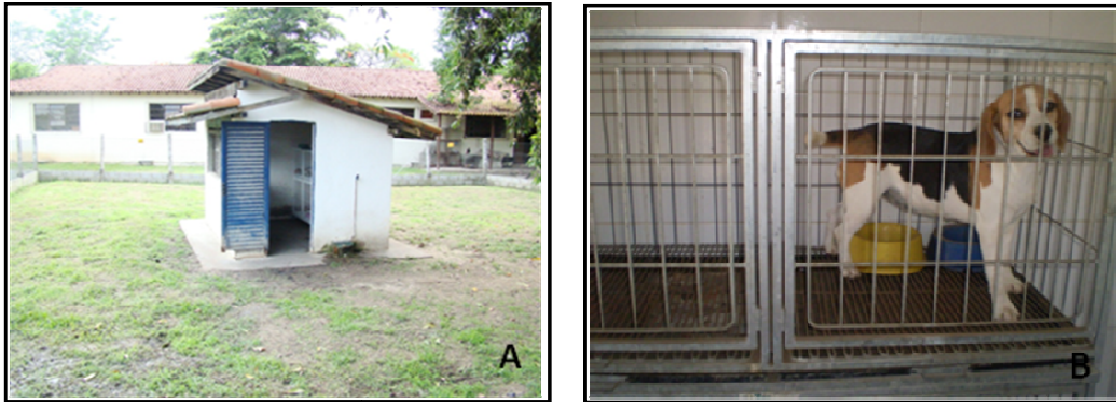


Figura 1. Ambiente gramado em que os animais eram mantidos ao longo do período experimental, com casa de alvenaria onde as gaiolas eram mantidas (A). Animal da raça Beagle mantido em gaiola galvanizada por um período de 72 horas, após a infestação com 300 casais de *Ctenocephalides felis felis*.



Figura 2. Gaiola de transporte utilizado para coleta dos ovos das pulgas, 72 horas após cada infestação, onde permaneciam por um período de quatro horas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O nim aplicado na formulação de 10% em dose única não causou efeito colateral no animal tratado, sugerindo se tratar de um composto seguro para aplicação em cães.

O número de larvas eclodidas dos grupos tratado e controle, a média e a respectiva eficácia ao longo de todo período experimental encontram-se na Tabela 1. A quantidade de ovos recuperados do grupo tratado foi significativamente menor quando comparados aos do grupo controle (Figura 3), imediatamente após a coleta do material nas gaiolas de transporte utilizadas na experimentação.

No dia +4, o número de larvas eclodidas do grupo controle foi de 47 enquanto no grupo tratado foram coletadas apenas duas larvas, resultando em uma eficácia de 95,78%. No dia +7, o número de larvas eclodidas do grupo controle foi de 48 e no grupo tratado de quatro larvas, representando uma eficácia de 91,75%. No dia +14 os números de larvas eclodidas do grupo controle foi o mais alto com um total de 56 e no grupo tratado foram coletadas dez larvas, com eficácia de 82,20%.

O número de larvas eclodidas no grupo controle no dia +21 foram os menores ao longo da experimentação, apenas 38 e o grupo tratado foram recuperadas 27 larvas, representando eficácia de apenas 28,91%. No dia +28 foram recuperadas 39 larvas do grupo controle e nenhuma larva do grupo tratado, sendo 100% eficaz no controle da eclosão das larvas. Os números de larvas eclodidas dos grupos controle e tratados do dia +35 foram de 40 e 21 respectivamente, com eficácia de 47,5%. No último dia da experimentação, dia +42, foi observada eficácia de 26,15%, recuperando 39 larvas do grupo controle e 29 larvas do grupo tratado.

A eficácia nos dias +4, +7, +14, +21, +28, +35, +42 foi de 95,78; 91,75; 82,2; 28,91; 100; 47,5 e 26,15% respectivamente, com eficácia média de 67,7%, ao longo de todo o período experimental (Figura 4).

No presente estudo foi avaliada a eficácia do nim na concentração de 10% no controle de larvas de *C. felis felis*, com o intuito de avaliar a eclodibilidade das larvas em testes *in vivo*. Diferentes trabalhos têm sido relatados na literatura sobre o uso do nim em pulgas, com diferentes metodologias e resultados. Kilonzo (1991) utilizando teste *in vitro* encontrou resultados superiores ao presente estudo, utilizando óleo de Nim na concentração de 50%, relatando a morte dos adultos a partir de 2 horas, alcançando eficácia de 95,3 e 94,7% após 24 horas no controle das espécies *C. felis* e *X. braziliensis* respectivamente.

Os resultados do presente trabalho são semelhantes aos descritos por Guerrini e Kriticos (1998) que empregaram extratos de nim em cães e gatos. O número de pulgas coletadas em ambas as espécies foi significativamente menor nos grupos tratados, resultando em um menor número de ovos. Os autores avaliaram a eclodibilidade dos ovos de *C. felis* apenas em testes *in vitro*, colocando o produto em placas de Petri e posteriormente os ovos, diferindo da metodologia do presente estudo, porém, com resultados semelhantes, com eficácia de 100% até o dia +7 e 80% no dia +14.

Outros biopesticidas vêm sendo utilizados no controle de pulgas. Os resultados do presente estudo são similares aos descritos por Hink et al. (1988) que empregaram em testes *in vitro* óleo de Linalool nas concentrações 0,5; 1,0; 5,0; e 10% com eficácia de 100% nas maiores concentrações ao testarem em ovos, larvas e pupas.

Tabela 1. Número de larvas de *Ctenocephalides felis felis* recuperadas de cães da raça Beagle, provenientes do grupo controle e tratado com uma formulação spray contendo 10% de nim.

Grupos/ Repetições	Número de larvas emergidas após 7 dias de cada dia de desafio						
	Dia +4	Dia + 7	Dia + 14	Dia + 21	Dia + 28	Dia + 35	Dia + 42
Controle							
01	5	6	9	6	5	6	8
02	7	10	10	7	5	8	5
03	10	9	9	8	6	8	7
04	9	8	8	6	9	7	7
05	8	8	10	6	6	6	5
06	8	7	10	5	8	5	7
Total	47	48	56	38	39	40	39
Média ± DP¹	7,83^a±1,6	8^a±1,3	9,33^a±0,7	6,33^a±0,9	6,5^a±1,5	6,67^a±1,1	6,5^a±1,1
Nim 10%							
01	0	1	1	8	0	5	6
02	0	0	4	8	0	4	6
03	1	0	2	7	0	2	7
04	1	0	0	4	0	4	6
05	0	1	0	0	0	3	3
06	0	2	3	0	0	3	1
Total	2	4	10	27	0	21	29
Média ± DP	0,33^b±0,5	0,66^b±0,7	1,66^b±1,5	4,5^a±3,5	0^b±0	3,5^a±1,0	4,8^a±2,1
Eficácia (%)	95,78	91,75	82,20	28,91	100	47,5	26,15

¹Desvio Padrão; Colunas com médias com mesma letra não diferem significativamente (p>0,05).

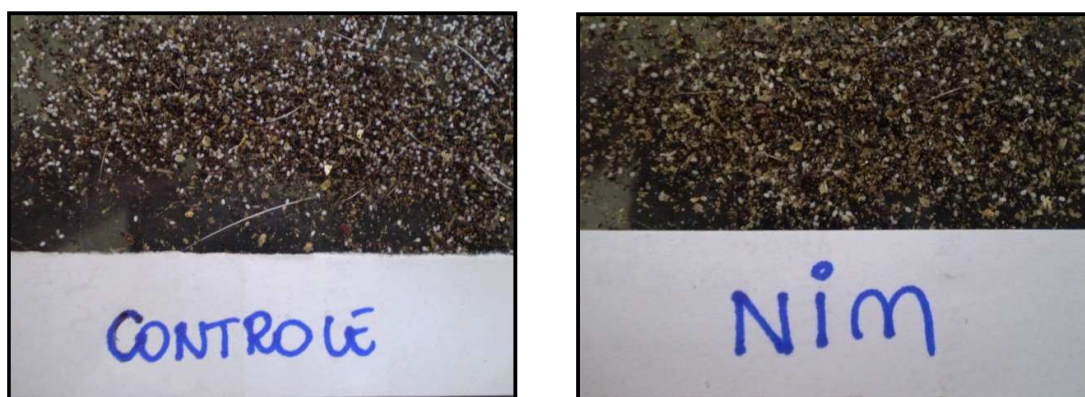


Figura 3. Material coletado dos transportes de ambos os grupos após um período de quatro horas. Notar uma maior quantidade de pontos brancos (ovos de *Ctenocephalides felis felis*) no grupo controle em relação ao grupo tratado com nim.

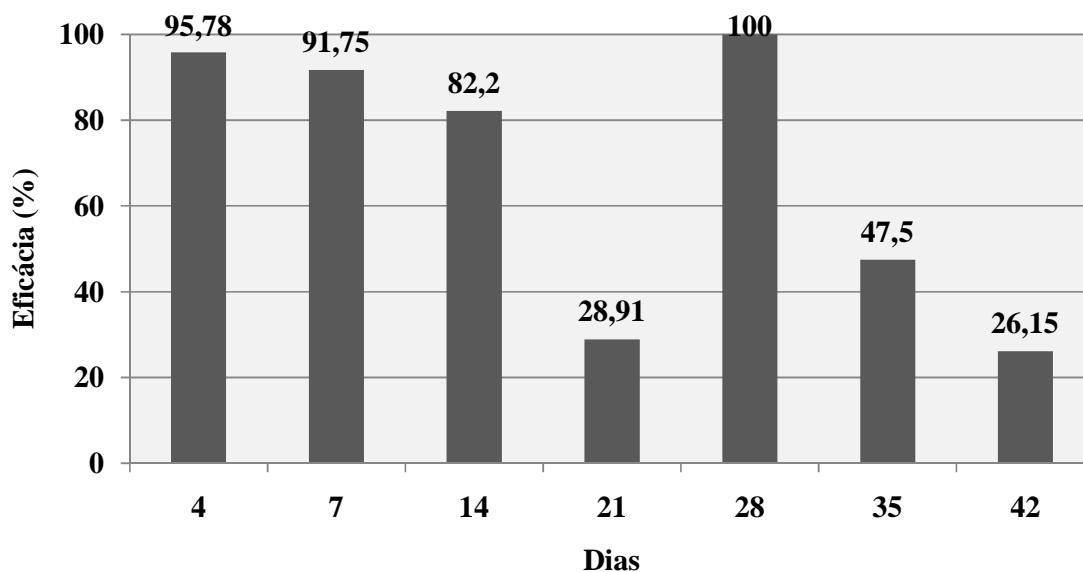


Figura 4. Eficácia do nim na concentração de 10%, no controle das larvas de *Ctenocephalides felis felis* em infestações artificiais realizadas em cães da raça Beagle.

Pelos resultados do presente trabalho, verifica-se a necessidade de novas pesquisas com o intuito de desenvolver novos produtos comerciais contendo extrato de nim. A atividade adulticida não foi objeto de avaliação no presente trabalho, mas de acordo com observações iniciais não houve diferença do número de pulgas adultas entre o grupo tratado e controle.

Os dados do presente trabalho corroboram com os disponíveis na literatura de que uma das principais atividades do nim é sua atuação como regulador de crescimento de insetos, inibindo o desenvolvimento larval. Por ser uma molécula fotossensível, com durabilidade no ambiente em torno de 20 dias, tem como vantagem não contaminar o meio ambiente e desvantagens de ser efetiva por períodos relativamente curtos ao compararmos com os produtos químicos. Eventuais aplicações realizadas quinzenalmente podem contribuir para o controle das pulgas.

CAPÍTULO II

**EFICÁCIA DO NIM (*Azadirachta indica*) NO CONTROLE DE *Rhipicephalus*
(*Boophilus*) *microplus* (CANESTRINI, 1887) (ACARI: IXODIDAE)**

RESUMO

Rhipicephalus (Boophilus) microplus é considerado um dos mais importantes ectoparasitos dos animais de produção. É encontrado parasitando principalmente bovinos, mas já foi descrito em búfalos, cavalos, cabras, burros, ovelhas, cervos, porcos e em outros animais selvagens. O carrapato é responsável por determinar em seus hospedeiros perda de peso, anemia, promover baixa conversão alimentar, queda na produção de leite e ainda transmitir diversos agentes patogênicos. O controle desse parasito tem se tornado muito difícil em virtude do alto grau de resistência dos carrapatos as principais moléculas químicas disponíveis. O presente trabalho foi realizado com objetivo de avaliar a eficácia do nim em diferentes concentrações através de testes *in vitro* e *in vivo* para o carrapato *Rhipicephalus (B.) microplus*. A eficácia para o teste *in vitro* foi de 7,64; 8,81 e 2,18% para as concentrações de 2, 5 e 10% respectivamente. Já para o teste *in vivo*, onde a metodologia utilizada foi a recomendada pela World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP). Os valores médios de eficácia foram de 11,3 e 17, 6%, para as concentrações 1 e 5% respectivamente. Pode-se concluir no trabalho que a emulsão de nim não é eficaz no controle do carrapato *Rhipicephalus (B.) microplus*.

Palavras-chave: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*; Carrapatos; Controle; Biopesticida

ABSTRACT

Rhipicephalus (Boophilus) microplus is considered one of the most important ectoparasites of production animals. It is commonly found parasitizing cattle; however it was described infesting buffaloes, horses, goats, sheep, cervids, pigs, and other wild species. This tick is responsible for determining weight loss and anemia, affecting dairy production and transmitting diverse pathological agents. Its control has been reported to be difficult because of the high incidence of resistance to major chemical molecules available. The objective of the present study was to evaluate the efficacy of different concentrations of a neem aqueous extract in the control of *Rhipicephalus (B.) microplus* ticks through *in vitro* and *in vivo* trials. The *in vivo* methodology followed the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP). The *in vitro* efficacy was 7.64, 8.81 and 2.18% for 2, 5 and 10% formulations, respectively. For the *in vivo* trial the mean efficacy levels were: 11.3 and 17.6%, for 1 and 5% formulations, respectively. It can be concluded that neem emulsion was not efficient on the control of *Rhipicephalus (B.) microplus* ticks.

Keyword: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*; Ticks; Control; Biopesticide

1 INTRODUÇÃO

Os carrapatos da família Ixodidae possuem em seu desenvolvimento quatro estágios bem definidos: ovo, larva, ninfa e adulto. Larvas e ninfas requerem sangue para que ocorra o processo de muda e as fêmeas para o processo de oviposição, caracterizando a importância de todas as fases evolutivas para seus hospedeiros.

Conhecido como carrapato do boi, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887), além dos bovinos, pode parasitar diversos hospedeiros, como: cervos, ovelha, camelo, e cavalos (JUBB; CAMPBELL, 2002), sendo considerados como agentes dispersores do carrapato, uma vez que larvas e adultos não são capazes de percorrer grandes distâncias. Está amplamente distribuído nas regiões tropicais e subtropicais do mundo e no Brasil é responsável por prejuízos anuais superiores a dois bilhões de dólares (GRISI et al., 2002).

O carrapato é responsável por determinar em seus hospedeiros perda de peso, anemia, pois cada carrapato ingere uma grande quantidade de sangue, além de promover baixa conversão alimentar, queda na produção de leite e ainda transmitir diversos agentes patogênicos como *Babesia* spp. e *Anaplasma* spp. (LITTLE, 1963; CAFRUNE et al, 1995; JONSSON, 2006; RIBEIRO et al., 2007; FERRARINI, et al., 2008).

Devido à alta pressão de seleção imposta pelo uso indiscriminado de acaricidas sintéticos, associados à aplicação incorreta do produto e o desconhecimento, por parte dos produtores, a respeito do ciclo do carrapato e dos grupos carrapaticidas utilizados intervalo entre os tratamentos feitos de maneira errônea, muitos carrapatos são, hoje, resistentes (CUTULLÉ et al., 2009), dificultando o seu controle.

Neste contexto, o desenvolvimento de novos produtos a partir de plantas representa uma nova opção para o tratamento do carrapato, reduzindo os impactos econômicos e ambientais ao uso de pesticidas químicos. O nim, *Azadirachta indica*, tem sido utilizado demonstrando eficácias variadas, principalmente em testes *in vitro*. O objetivo do trabalho foi avaliar a eficácia de diferentes concentrações de nim, no controle do carrapato *Rhipicephalus (B.) microplus* através de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A utilização de biopesticidas tem sido descritas por diversos autores. O óleo de nim foi utilizado com sucesso por Kaaya et al. (2007) no controle de *Amblyomma variegatum* em caprinos e em coelhos, como também para o controle de *A. variegatum*, *Rhipicephalus appendiculatus* e *Boophilus decoloratus* em bovinos. Verificaram que a eficácia está diretamente ligada a concentração do óleo, controlando todas as fases imaturas do carrapato. Os períodos de fixação no hospedeiro e de muda foram significativamente maiores nos animais tratados. A formulação spray contendo óleo de nim a 25% reduziu por até cinco dias o número de carrapatos das espécies *A. variegatum*, *R. appendiculatus* e *B. decoloratus* em bovinos.

Os extratos de nim também foram eficazes no controle do carrapato *Hyalomma anatolicum excavatum*, onde, através de testes *in vitro*, o tempo de eclosão das larvas foi mais rápido no grupo tratado com óleo de nim, levando a larvas a alterações em sua morfologia e posterior morte. Ao utilizarem um produto comercial com 5% de azadiractina obtiveram 100% de mortalidade das larvas e na concentração de 12,8%, a mesma eficácia em ninfas e adultos não ingurgitados. Na mesma concentração não foi observado eclodibilidade das larvas (ABDEL-SHAIFY; ZAYED, 2002).

Os resultados relatados por Maharaj et al. (2005) empregando teste de imersão em carrapatos da espécie *Rhipicephalus (B.) microplus* que não haviam sido expostos a qualquer acaricida por pelo menos seis semanas, relataram uma eficácia de 56%. Esses resultados são semelhantes aos relatados por Shrivastava e Das (2003) que empregando a mesma metodologia descreveram uma eficácia de 52,46%.

O efeito adulticida no controle do carrapato *Rhipicephalus (B.) microplus* não foi observado. Entretanto, a postura e eclodibilidade foram severamente alteradas de acordo com a formulação e a concentração do produto (GUPTA et al., 1998). Os relatos de Silva et al. (2002) são similares aos descritos por Gupta et al. (1998) no que diz respeito ao efeito adulticida, ao utilizarem duas formulações comerciais contendo 1% de nim em diferentes diluições: 1, 5, 10, 35 e 50%. Entretanto, nas diluições de 50%, relataram uma eficácia de 96,33% e 68,35%, com alterações significativas na taxa de eclosão das larvas. Alwin et al. (2007) empregaram o óleo de nim no controle de larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus*. Oitenta e quatro horas após a aplicação do produto foi observada uma mortalidade de 45% de adultos e 90% de larvas.

Silva et al. (2007) relatam alterações causadas pelo emprego do nim no controle de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (B.) microplus* e *R. sanguineus* através de testes *in vitro*, alterando o período de pré-postura, postura e massa total de ovos produzidas para ambas as espécies. Entretanto, a eficácia da planta no controle destas espécies de carrapato foi de 30,0 e 26,3% para *Rhipicephalus (B.) microplus* e *R. sanguineus*, respectivamente.

Ao empregar extrato aquoso de nim nas concentrações de 5, 10, 20 e 33% no controle de larvas de *Rhipicephalus (B.) microplus* utilizando o teste sanduíche, Furlong et al. (2002) relataram a alta concentração letal das larvas, que mesmo sendo eficaz nos testes *in vitro*, sua utilização a campo seria inviável. Silva et al. (2002) empregaram diversas concentrações de um produto comercial a base de nim, através de testes de imersão em fêmeas ingurgitadas. Na concentração indicada pelo fabricante a eficácia do produto foi inferior a 10%. Os resultados são similares aos descritos por Saueressig (2002) ao empregar uma formulação comercial contendo extratos de nim no controle de teleóginas de *Rhipicephalus (B.) microplus*, em teste *in vitro*, onde o produto não apresentou nenhuma atividade ovarioestática, tão pouco antiembriônica, já que a postura dos ovos e a eclosão das larvas não foram inibidas.

Farias et al.(2006), empregaram diluições de 10 e 25% feitas a partir do óleo bruto de nim. Apesar de não serem observados carrapatos adultos mortos, os resultados obtidos os autores relataram 100% na inibição da postura das fêmeas ingurgitadas tratadas por ambas as concentrações.

Os resultados descritos por Benavides et al. (2001) em seus estudos utilizaram extrato aquoso de nim na concentração de 5% a cada vinte e um dias em bovinos naturalmente infestados onde relataram eficácia similar ao grupo tratado com amitraz. Utilizando a mesma concentração, Webb e David (2002) empregaram extratos de nim no controle de carrapatos em bovinos naturalmente infestados e mantidos em um campo contaminado com as espécies de carrapato: *A. hebraeum*, *R. evertsi*, *H. truncatum* e *B. decoloratus*. Os resultados obtidos pelos autores são promissores uma vez que a média de carrapatos presentes nos animais do grupo tratado foi de 19,75%.

Outros produtos fitoterápicos vêm sendo utilizados no controle do carrapato do boi *Rhipicephalus (B.) microplus*, em seus estudos, Júnior et al. (2002) empregaram com eficácia de 97,8% extratos da planta *Derris urucu* na concentração de 10 mg / ml no controle de teleóginas do carrapato *Rhipicephalus (B.) microplus* através de teste de imersão.

Peneluc et al. (2004) empregaram extratos da planta *Zanthoxylum rhoifolium* não obtendo nenhuma eficácia no controle das teleóginas.

Ao empregar extratos de *Eucalyptus citriodora*, Clemente et al. (2004) obtiveram em seus estudos eficácias de 49,7; 72,2; 80,2 e 94%, respectivamente nas concentrações de 6,25; 12,5; 25 e 50%, sobre a inibição da oviposição de teleóginas.

Outras plantas já foram descritas na literatura por apresentar eficácia contra o carrapato *Rhipicephalus (B.) microplus*. Borges et al. (2005) utilizaram extrato alcoólico de *Melia azedarach*, utilizaram oito bezerros divididos em dois grupos, infestados artificialmente com larvas de *Rhipicephalus (B.) microplus*, comparando o número de teleóginas recuperadas nos grupos tratado e controle, assim como peso das mesmas e percentual de ecdisse.

Mendes et al. (2006) ao empregarem, *in vitro*, extratos obtidos da raiz e do caule das plantas *Piper scutifolium* e *P. corcovadensis*, obtiveram eficácia de 100% na inibição da postura de fêmeas ingurgitadas do carrapato em questão.

Ainda no ano de 2006, ao empregar solução aquosa, solução aquosa por infusão e solução alcoólica da planta *Chenopodium abrosioides*, Trivilin et al. obtiveram eficácia de 31,71; 27,11 e 45,91%, respectivamente. Já Teixeira et al. (2007b), ao testarem óleo de nim a 10%, obtiveram eficácia de 15,89%, e relataram, no mesmo estudo, a atividade de outros fitoterápicos como *Ricinus communis* e *Momordica charantia*, obtendo, respectivamente, eficácias de 9,96% e 3,34%.

Em 2006, Vale et al. empregaram extrato aquoso da planta *C. nardus* na concentração de 50% em fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (B.) microplus*. Mesmo utilizando a concentração de 50% e deixando as teleóginas imersas por 10 minutos, não foi verificada eficácia da formulação. No mesmo ano, Antonio et al. empregaram extratos da planta *C. ambrosioides* no controle de *Rhipicephalus (B.) microplus* e *A. nitens*, cujos resultados foram, respectivamente, de 100% e 80% de eficácia, no que concerne percentuais de eclosão de larvas advindas de postura de teleóginas tratadas.

Ainda em 2007, Pires et al. empregaram o óleo de nim em diferentes concentrações no controle de *Rhipicephalus (B.) microplus* utilizando testes de imersão em teleóginas recém coletadas. Ao utilizarem a concentração de 100%, houve uma mortalidade de 70% e um índice de eficiência reprodutiva de 4,61%, muito menor em relação ao grupo controle que foi imerso em água e teve como índice o valor de 52,26%. Já a taxa de eclosão das larvas foi de 65%. Ao empregar a concentração de 75% a mortalidade caiu para 45%, com taxa de eclosão

de 80%. Os resultados nas concentrações 50 e 25% não apresentaram diferenças significativas, com mortalidade de 5% e eclodibilidade de quase 100%. Ao utilizarem extratos oleosos da planta *M. azedarach*, Sousa et al. (2008) observaram eficácia de 100% no controle das fêmeas ingurgitadas na concentração de 0,25%. No mesmo trabalho, foi testada a eficácia para larvas de *Rhipicephalus (B.) microplus* onde as concentrações de 0,25 e 0,125% foram 100% eficaz após a realização de testes de imersão no final do período experimental que foi de 168 horas.

Em seus estudos, Ribeiro et al. (2008) utilizaram a fase de larva, por considerarem-na mais susceptível as diferentes formas de controle, em vez de fêmeas ingurgitadas. Os autores relataram uma eficácia de 100% ao empregarem através de teste de imersão das larvas, o óleo da planta *Drimys brasiliensis*, 48 horas após a aplicação do produto.

Embora seu efeito adulticida não seja relatada na maioria dos trabalhos, Srivastava et al. (2008) obtiveram uma eficácia superior a 80% após utilizarem extratos de Nim na concentração de 8%, em testes *in vitro*, no controle de *Rhipicephalus (B.) microplus*, onde foi relatado ausência de mobilidade dos carrapatos à presença de iluminação. Os carrapatos remanescentes do teste foram aclimatizados em estufas tipo B.O.D. a uma temperatura de 28 °C e umidade de 85% para acompanhamento dos índices reprodutivos, onde mais uma vez os extratos de nim produziram uma redução na massa de ovos. Os resultados obtidos no estudo não diferiram significativamente quando comparados ao emprego de acaricidas sintéticos. Ainda no presente estudo, foi testado o extrato através de testes *in vivo*, utilizando bovinos artificialmente infestados com larvas. Os resultados demonstram uma eficácia de 70% até o dia +5 de experimentação. A ausência de diferença significativa nos resultados obtidos ao comparar o uso do nim com acaricidas sintéticos também foi relatado por Valente et al. (2007) que compararam o emprego de extrato aquoso de nim aplicado através de banhos a cada sete dias, com o uso de abamectina aplicado em dose única no controle de *Rhipicephalus (B.) microplus* em bovinos naturalmente infestados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Avaliação da eficácia do nim em testes *in vitro* para *Rhipicephalus (B.) microplus*

Foram coletadas 120 fêmeas ingurgitadas da espécie *Rhipicephalus (B.) microplus*, provenientes de animais infestados artificialmente. Após a coleta, as fêmeas ingurgitadas foram previamente identificadas, lavadas, pesadas e distribuídas em placas de Petri de maneira que seus pesos fossem semelhantes.

Foi utilizada a emulsão de nim, a partir do óleo de nim puro, adquirido do laboratório Natural Rural®. Para o preparo da emulsão foi acrescentado a uma parte do óleo, tween 80 (emulsificante) na concentração de 30%. Posteriormente, a solução foi levada a um agitador magnético com aquecimento, onde permanecia por 10 minutos a uma temperatura de 40° C, completando até a quantidade desejada com água.

Os testes de imersão seguiram a metodologia proposta por Drummond et al. (1973) onde os carrapatos são imersos por um período de 5 minutos nas formulações em teste e o grupo controle foi imerso em água. As fêmeas ingurgitadas foram separadas em quatro grupos com três repetições cada: Grupo 1, grupo controle, grupo 2, tratado com emulsão de nim na concentração de 2%, grupo 3, tratado com nim na concentração de 5% e finalmente grupo 4 onde foi aplicado o produto na concentração de 10%.

Os carrapatos foram secos, fixados, utilizando fita dupla-face, e colocados em câmaras climatizadas com demanda biológica de oxigênio a uma temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa superior a 80%. A leitura de postura foi feita 15 dias após o tratamento e a eclodibilidade foi avaliada após 45 dias do início do teste. A eficácia das formulações foi avaliada através da comparação do índice de eficiência reprodutiva ($\text{IER} = \text{peso dos ovos/peso das fêmeas} \times 20000 \times \% \text{ eclodibilidade}$) e a eficiência carrapaticida ($\text{EC} = (\text{IER controle} - \text{IER tratamento})/\text{IER controle} \times 100$). A análise estatística foi feita através do teste que χ^2 e para comparação entre as médias o teste de Kruskal-Wallis.

3.2 Avaliação da eficácia do nim em testes *in vivo* para *Rhipicephalus (B.) microplus*

Para avaliação da eficácia *in vivo* da formulação em teste contendo 1 e 5% de emulsão de nim, foi empregada a metodologia desenvolvida por (HOLDSWORTH, 2006) e recomendada pela WAAVP – Associação Mundial para avanço da Parasitologia Veterinária (2006) – para testes carrapaticidas em ruminantes.

Toda parte experimental envolvendo os ensaios *in vivo* com os bovinos foram realizados na estação experimental para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Os animais foram alojados em dois galpões distintos onde os animais do grupo controle não tiveram contato com os animais tratados (Figura 1). O preparo de nim seguiu a metodologia utilizada no preparo do teste *in vitro*.

Foram utilizados quinze bezerros mestiços da raça Girolando, com um ano de idade, adquiridos de produtores rurais do Município de Valença, Rio de Janeiro, isentos de produtos parasiticidas por um período de 60 dias. Durante todo o período experimental, os animais permaneceram em baias individuais, sobre estrados de madeira, de maneira que os carrapatos pudessem ser coletados com intervalos de 24 horas (Figura 2). Todos os animais foram infestados com 2500 larvas não alimentadas de *Rhipicephalus (B.) microplus* oriundos de uma colônia mantida no Laboratório de Quimioterapia Experimental de Produtos Parasiticidas (LQEPV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, nos dias -23, -21, -19, -17, -15, -13, -11, -9, -7, -5, -3, -1.



Figura 1. Galpão onde eram mantidos os animais pertencentes ao grupo tratado com a formulação em teste contendo 1% de nim (animais à esquerda) e 5% de nim (animais à direita).



Figura 2. Baias individuais com estrados de madeira onde eram mantidos os animais durante todo período experimental.

Nos dias -3, -2, -1, as fêmeas ingurgitadas recuperadas de cada animal foram quantificadas e pesadas, sendo realizado o ranqueamento dos animais de acordo com o número de carrapatos recuperados. Os animais foram divididos em três grupos com cinco animais cada. O grupo 1 foi mantido sem tratamento, grupo controle. O grupo 2 foi tratado com o produto na concentração de 1% e o grupo 3 foi tratado com o produto na concentração de 5%. Os animais do grupo tratado foram medicados com a emulsão de nim com auxílio de bomba costal de alavanca da marca Jacto, utilizando quatro litros da emulsão de nim por animal.

As fêmeas ingurgitadas foram coletadas diariamente em todos os grupos experimentais até o dia + 23. Após a contagem dos carrapatos, foram separadas duas alíquotas com 10 teleóginas cada, proveniente de cada grupo experimental, onde foram avaliados os respectivos pesos, posturas e percentuais de eclosão.

A eficácia de cada formulação foi calculada através da seguinte fórmula: $Eficácia = 100 - [100 \times (A \times D) / (B \times C)]$, Onde: A = número médio de carrapatos do controle antes do tratamento (dia -3, -2 e -1); D = número médio de carrapatos do tratado do dia de avaliação; B = número médio de carrapatos do controle do dia de avaliação; C = número médio de carrapatos do tratado antes do tratamento (dia -3, -2 e -1). A eficácia das formulações ainda foi avaliada através da comparação dos índices de eficiência reprodutiva (IER= peso dos ovos/peso das fêmeas x 20000 x % eclodibilidade) e posterior cálculo da eficiência carrapaticida (EC = (IER controle – IER tratamento)/IER controle x 100). A análise estatística foi feita através do teste que χ^2 e para comparação entre as médias o teste de Kruskal-Wallis.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teste *in vitro*

Os resultados do teste *in vitro* utilizando diferentes concentrações de extrato de nim, em teleóginas coletadas diretamente dos hospedeiros encontram-se listados na Tabela 1.

As fêmeas ingurgitadas coletadas diretamente de seus hospedeiros foram separadas em quatro grupos com três repetições cada: grupos controle e tratados com nim nas concentrações de 2, 5 e 10%. No dia da experimentação as teleóginas foram identificadas, lavadas e separadas de maneira que seus pesos fossem uniformes, variando de 2,313 a 2,343 gramas. O peso das posturas e do percentual de eclosão não variou entre os grupos controle e tratados, assim como o índice de eficiência reprodutiva.

As eficácias carrapaticidas das formulações encontram-se na Figura 3.

Tabela 1. Peso das teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, das respectivas posturas, percentual de eclosão e índices de eficiência reprodutiva dos grupos controle e tratados nas diferentes concentrações de nim, em teste *in vitro*.

Grupo / Repetições	Peso teleóginas (g)	Peso Postura (g)	% Eclosão	IER
Controle				
1	2.342	1.169	91	908445,8
2	2.319	1.208	97	1010574
3	2.343	1.185	99	1001408
Média	2.335	1.187	96	973475,9
Nim 2%				
1	2.302	1.140	87	861685,5
2	2.332	1.020	98	857289,9
3	2.304	1.150	98	978298,6
Média	2.313	1.103	94	899091,3
Nim 5%				
1	2.316	1.108	83	794162,3
2	2.316	1.209	96	1002280
3	2.337	1.066	95	866666,7
Média	2.323	1.128	91	887702,9
Nim 10%				
1	2.340	1.076	96	882871,8
2	2.325	1.235	98	1041118
3	2.319	1.229	88	932746,9
Média	2.328	1.18	94	952245,6

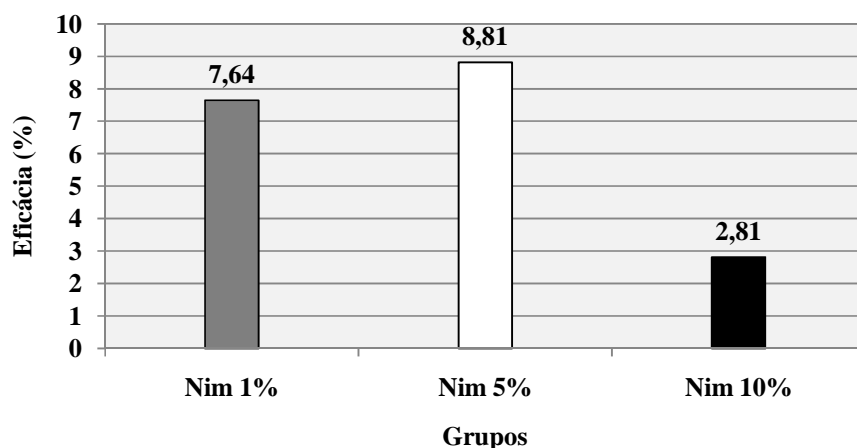


Figura 3. Eficácia carrapaticida das formulações em teste no controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em teste *in vitro*.

A eficácia carrapaticida do grupo tratado com nim na concentração de 2% foi de 7,64% e com o produto na concentração de 5% foi de 8,81%. Já no grupo tratado na concentração de 10%, a eficácia calculada foi de 2,18%. Os resultados obtidos nos ensaios apresentaram baixa eficácia, principalmente ao comparar com formulações químicas. Embora utilizado em ensaios *in vitro*, concentrações acima de 5% não são viáveis do ponto de vista comercial em virtude dos altos custos.

Os resultados do presente estudo são inferiores aos relatados por Farias et al. (2006) que empregaram diluições de 10 e 25% feitas a partir do óleo bruto de nim. Apesar de não serem observados carrapatos adultos mortos em ambos os experimentos, os resultados obtidos por Farias observaram 100% na inibição da postura das fêmeas ingurgitadas tratadas por ambas as concentrações. Os resultados também foram inferiores aos relatados por Teixeira et al. (2007b), que ao testarem óleo de nim a 10%, obtiveram eficácia de apenas 15,89%. Os mesmos autores relataram a atividade de outros fitoterápicos como *Ricinus communis* e *Momordica charantia* que tiveram eficácia inferior ao presente estudo com nim com eficácias de 9,96% e 3,34%, respectivamente.

Os resultados aqui demonstrados são inferiores aos relatados em 2002 por Furlong et al. que empregaram extratos de nim na concentração de 5, 10, 20 e 33%. Porém, os autores utilizaram o produto no controle de larvas não alimentadas enquanto o presente estudo limitou-se apenas no teste *in vitro* a utilizar o produto no controle de fêmeas ingurgitadas, impossibilitando a comparação de resultados. Os resultados foram altamente eficazes, entretanto, foram observadas altas concentrações letais para as larvas, inviabilizando o desenvolvimento de formulações comerciais.

Abdel-Shafy e Zayed (2002), obtiveram resultados eficazes no controle do carrapato *Hyalomma anatolicum excavatum*, onde, através de testes *in vitro*, o tempo de eclosão das larvas foi mais rápido no grupo tratado com óleo de nim, onde as larvas apresentavam alterações em sua morfologia e posterior morte. Ainda no mesmo trabalho, os autores utilizaram um produto comercial com 5% de Azadiractina obtendo 100% de mortalidade das larvas e na concentração de 12,8%, a mesma eficácia em ninfas e adultos não ingurgitados. Na mesma concentração não foi observado eclodibilidade das larvas.

Os resultados obtidos neste estudo foram também inferiores aos de Maharaj et al. (2005) onde empregando teste de imersão em carrapatos da espécie *Rhipicephalus (B.)*

microplus que não haviam sido expostos a qualquer acaricida por pelo menos seis semanas, relataram uma eficácia de 56%. Assim como os resultados relatados por Shrivastava e Das (2003) que empregando a mesma metodologia descreveram uma eficácia de 52,46%.

Em 2008, Srivastava et al. obtiveram resultados superiores ao presente estudo, ao relatarem eficácia superior a 80% após 5 horas de exposição ao extrato aquoso de nim na concentração de 8%, aplicados através de teste de imersão em fêmeas ingurgitadas, onde permaneceram por apenas um minuto. As teleóginas que não morreram tiveram uma redução significativa na oviposição, com resultados superiores ao compararmos a utilização com componentes químicos.

Os resultados do presente estudo também são inferiores aos descritos por Silva et al. (2007) que relataram eficácia de 30% no controle do carrapato *Rhipicephalus (B.) microplus* através de testes *in vitro* em fêmeas ingurgitadas, embora não tenham mencionado a concentração utilizada e terem deixados as teleóginas imersas por 10 minutos. Entretanto, o peso das posturas no presente trabalho não apresentou grandes variações entre os grupos e no trabalho de Silva et al., a massa total de ovos no grupo tratado foi inferior. No mesmo trabalho, tais autores testaram o uso de *C. citratus* (capim-santo) com resultados superiores a utilização de nim, com média de eficácia de 42%.

Os resultados do presente trabalho são similares aos descritos por Silva et al. (2002) onde utilizaram extratos de nim na diluição recomendada pelo fabricante com eficácia inferior a 10%. Porém, no mesmo trabalho, a eficácia carrapaticida subiu para 96,3 e 48,9% quando empregaram concentrações de 50 e 45 % de extratos de nim, respectivamente. Os resultados descritos são superiores aos relatados por Saueressig (2002) que empregou extratos de nim no controle de teleóginas de *Rhipicephalus (B.) microplus*. O produto não apresentou eficácia, pois não demonstrou atividade ovarioestática ou antiembriogênica, ou seja, a postura e a eclosão não foram inibidas.

Pires et al. (2007) relataram uma eficácia de apenas 5% no controle de teleóginas da espécie *Rhipicephalus (B.) microplus* uma vez que quase 100% dos ovos eclodiram ao administrar extratos de nim na nas concentrações de 25 e 50%, resultados similares ao presente estudo.

Os extratos de nim também vêm sendo empregados no controle de larvas de *Rhipicephalus (B.) microplus*. Silva et al. (2007) empregaram extratos de nim na concentração de 10% e obtiveram resultados médios de eficácia de 35,9; 54,3 e 70,8%, para os tempos de 10; 20 e 40 minutos respectivamente de contato com o produto através do método sanduíche. Os resultados são superiores aos do presente estudo, mas vale ressaltar que os estágios imaturos são mais susceptíveis aos métodos de controle.

Outros biopesticidas vêm sendo utilizados no controle do carrapato do boi *Rhipicephalus (B.) microplus* com resultados superiores ao presente estudo. Júnior et al. (2002) empregaram com eficácia de 97,8% extratos da planta *Derris urucu* na concentração de 10 mg / ml no controle de teleóginas do carrapato *Rhipicephalus (B.) microplus* através de teste de imersão seguindo a metodologia do presente estudo.

Mendes et al. (2006) empregaram extratos obtidos da raiz e do caule das plantas *Piper scutifolium* e *Piper corcovadensis* através de testes *in vitro*, obtendo 100% de eficácia na inibição da postura das fêmeas ingurgitadas. No mesmo ano, Trivilin et al. obtiveram eficácia de 31,71; 27,11 e 45,91% ao empregarem solução aquosa, solução aquosa por infusão e solução alcoólica respectivamente da planta *Chenopodium abrosoides*.

Em 2004, Pires et al. utilizando a planta *Simarouba versicolor* obtiveram resultados superiores aos do presente estudo, com 100% de eficácia no controle do carrapato bovino, uma vez que não foi observado oviposição das fêmeas tratadas com a planta. Já Clemente et

al. (2004) relataram melhores resultados do que os encontrados no presente estudo ao empregarem extratos da planta *Eucalyptus citriodora*, com eficácia de 49,7; 72,2; 80,2; 94 % para as concentrações 6,25; 12,5; 25,0; 50,0 % respectivamente.

Ao utilizarem extratos da planta *M. azedarach* sobre fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (B.) microplus*, Sousa et al. (2004) obtiveram eficácia de 23,7% ao utilizarem testes de imersão das teleóginas, resultados similares aos encontrados no presente trabalho. Já Sousa et al. (2008) empregando extratos oleosos da mesma planta, relataram eficácia superior ao presente estudo, pois obtiveram eficácia de 100% no controle das fêmeas ingurgitadas ao utilizarem a concentração de 0,25%. No mesmo trabalho, foi testada a eficácia para larvas de *Rhipicephalus (B.) microplus* onde as concentrações de 0,25 e 0,125% foram 100% eficaz após a realização de testes de imersão no final do período experimental que foi de 168 horas.

Os resultados relatados por Ribeiro et al. (2008) são superiores ao presente estudo, embora os autores tenham usado a fase de larva, considerada mais susceptível as diferentes formas de controle, em vez de fêmeas ingurgitadas. Os autores relataram uma eficácia de 100% ao empregarem através de teste de imersão em larvas, o óleo da planta *Drimys brasiliensis*, quarenta e oito horas após a aplicação do produto.

Entretanto, alguns biopesticidas apresentam resultados inferiores ao presente estudo. Sousa et al. (2004) não obtiveram sucesso ao empregarem extrato da planta *Himatanthus sucubus*, através de testes *in vitro*, com teleóginas da espécie *Rhipicephalus (B.) microplus*. No mesmo ano, Peneluc et al. empregaram extratos da planta *Zanthoxylum rhoifolium* não obtendo nenhuma eficácia no controle das teleóginas. Em 2007, Vale et al. empregaram extrato aquoso da planta *C. nardus* na concentração de 50% em fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (B.) microplus*. Mesmo utilizando a concentração de 50% e deixando as teleóginas imersas por 10 minutos, não foi verificada eficácia da formulação. No mesmo ano, Antonio et al. empregaram extratos da planta *C. ambrosioides* no controle de *Rhipicephalus (B.) microplus* e *A. nitens*. Os resultados relatados foram descritos avaliando os respectivos percentuais de eclosão das larvas oriundas das teleóginas tratadas, onde houve 100% de eclosão para *Rhipicephalus (B.) microplus* e 80% de eclosão para *A. nitens*, resultados inferiores ao presente estudo.

Os resultados do presente trabalho permitem afirmar que as concentrações de 2, 5 e 10% não são capazes de controlar o carrapato *Rhipicephalus (B.) microplus* em condições laboratoriais.

Muitos trabalhos estão sendo desenvolvidos utilizando fitoterápicos no controle dos carrapatos, principalmente nos da espécie *Rhipicephalus (B.) microplus* que apresentam marcada resistência a diversas drogas químicas empregadas em seu controle. Outros aspectos que merecem destaque relacionado ao aumento no uso da biopesticidas são os amplos períodos de carência que devem ser respeitados para o consumo de carne, leite e seus derivados ao utilizar controle químico, além do aumento da exigência por parte de mercados consumidores em consumir alimentos livres de drogas químicas. Quase que uma totalidade dos trabalhos publicados aborda apenas o controle realizado através de teste *in vitro*, pois são testes rápidos, práticos, baratos, mas muitas vezes não representam o que ocorre ao aplicar nos animais. Outro fato que justifica um pequeno número de testes *in vivo* está nos resultados frustrantes relatados por muitos pesquisadores, inclusive os do presente estudo.

Outro fato a ser abordado é a falta de ensaios *in vivo* padronizados para uso de biopesticidas nos animais domésticos, dificultando análises e comparações. Assim sendo, os ensaios utilizando teste *in vivo* serão os mesmos recomendados pela WAAVP – World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (HOLDSWORTH, 2006), guia usado na avaliação da eficácia de acaricidas químicos contra carrapatos de ruminantes.

4.2 Teste *in vivo*

Os resultados das contagens diárias dos carrapatos recuperados de cada animal, nos respectivos grupos experimentais, encontram-se na (Tabela 2). O número de carrapatos coletados diariamente não variou estaticamente nos diferentes grupos experimentais. Foram recuperadas um total de 8214 fêmeas ingurgitadas do grupo controle, com média de 357,1 carrapatos. O grupo tratado com nim na concentração de 1% apresentou um maior número de carrapatos coletados, com um total de 8214, com média de 357,1 carrapatos ao longo do período experimental. Já o grupo tratado na formulação contendo 5% de nim apresentou um menor numero de carrapatos coletados, com 7319, correspondendo a uma média de 318,2 carrapatos.

A eficácia carrapaticida do nim, calculada a partir da WAAVP, foi de 11,3 e 17,6% nas concentrações de 1 e 5%, respectivamente (Figura 4). O peso médio do total de teleóginas recuperadas também foi critério de comparação entre os diferentes grupos, porém não houve diferença significativa entre as médias dos grupos experimentais. O peso médio de todas as fêmeas ingurgitadas recuperadas do grupo controle foi de 0,206 mg, enquanto para os grupos tratados com nim na concentração de 1 e 5% foram de 0,213 e 0,206 mg, respectivamente (Tabela 3).

Como parte da metodologia utilizada no presente estudo, foram separados do total de teleóginas coletadas em cada dia de experimentação, duas repetições por grupo contendo 10 teleóginas cada. Os carrapatos eram primariamente selecionados de maneira aleatória, lavados em água corrente e secos em papel de filtro. Após o processo, os carrapatos eram pesados (Tabela 4) e colocados em placas de Petri que permaneciam em estufas climatizadas tipo BOD com temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $80 \pm 10\%$. Após vinte e um dias as respectivas posturas eram pesadas (Tabela 5) e transferidas para seringas adaptadas onde eram colocadas nas mesmas estufas até o momento da eclosão.

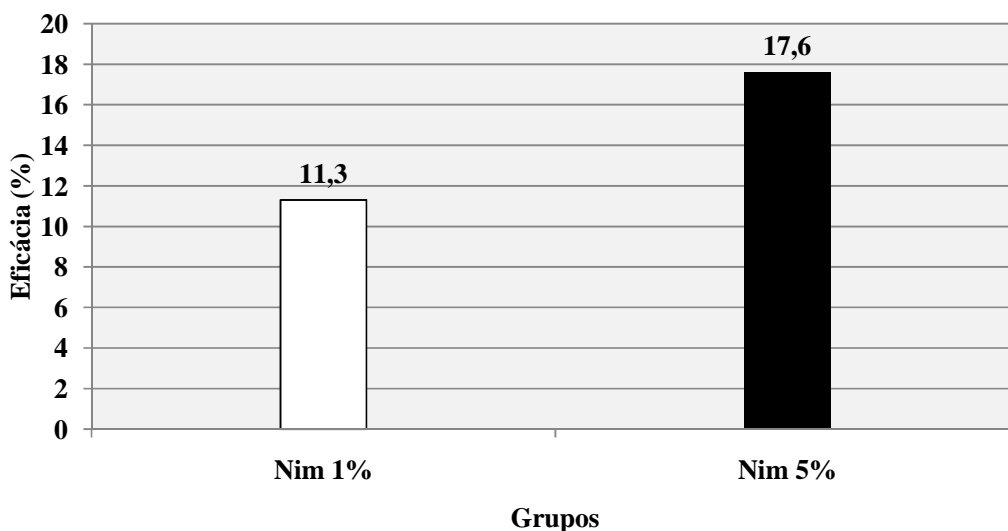


Figura 4. Eficácia média das concentrações de nim a 1 e 5% no controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* durante os vinte e um dias de experimentação.

Tabela 2. Número total e médio de teleóginas da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* coletadas dos animais por dia de experimentação, distribuídos nos diferentes grupos.

Grupos/ Animais	Número de teleóginas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> recuperadas por dia de desafio												
	-3	-2	-1	+1	+2	+3	+4	+5	+6	+7	+8	+9	+10
Controle													
1832	90	72	66	49	36	50	91	72	73	125	55	61	41
45	16	16	23	21	30	27	35	18	40	36	23	22	11
173	41	27	26	35	36	40	48	46	74	44	24	34	54
60	113	118	123	157	155	165	222	201	270	376	269	223	200
5	109	70	47	64	60	61	89	112	122	126	152	121	64
Média	73,8^a	60,6^a	57^a	65,2^a	63,4^a	68,6^a	97^a	89,8^a	115,8^a	141,4^a	104,6^a	92,2^a	74^a
DP¹	38,6	36,4	36,5	48,1	46,9	49,5	66,3	63,6	81,4	123,4	94,8	73,8	65,5
Nim 1%													
62	99	226	188	184	228	150	212	173	228	202	135	117	124
1822	37	27	14	25	26	21	36	52	63	64	44	74	50
64	28	18	18	15	3	16	32	57	60	53	20	39	22
61	85	51	45	48	25	92	115	135	106	78	41	22	30
66	110	91	65	47	71	105	130	152	125	125	136	91	116
Média	71,8^a	82,6^a	66^a	63,8^a	70,6^a	76,8^a	105^a	113,8^a	116,4^a	104,4^a	75,2^a	68,6^a	68,4^a
DP	33,2	76,0	63,8	61,4	81,7	51,4	66,7	49,9	61,1	54,6	49,9	34,4	43,2
Nim 5%													
89	84	74	50	38	37	46	53	43	51	80	33	32	43
97	133	114	94	55	65	137	164	136	162	71	53	70	71
63	5	14	10	17	15	18	21	14	27	26	28	21	18
59	116	93	44	92	66	114	88	211	173	136	99	131	88
14A	44	12	28	52	44	45	56	56	109	63	50	39	41
Média	76,4^a	61,4^a	45,2^a	50,8^a	45,4	72^a	76,4^a	92^a	104,4^a	75,2^a	52,6^a	58,6^a	52,2^a
DP	46,9	41,5	28,1	24,6	19,0	45,4	48,7	71,9	58,1	35,5	25,1	39,7	24,6

¹Desvio padrão; Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem significativamente (P>0,05).

Tabela 2. Continuação.

Grupos/ Animais	Número de teleóginas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> recuperadas por dia de desafio												
	+11	+12	+13	+14	+15	+16	+17	+18	+19	+20	+21	+22	+23
Controle													
1832	60	91	78	125	99	71	82	24	17	12	5	5	0
45	11	21	38	39	41	28	15	9	5	7	2	0	0
173	45	70	51	36	31	37	29	18	7	18	7	3	0
60	232	239	223	175	232	163	128	58	28	39	9	5	0
5	109	122	97	94	145	108	92	47	19	35	5	7	6
Média	91,4^a	108,6^a	97,4^a	93,8^a	109,6^a	81,4^a	69,2^a	31,2^a	15,2^a	22,2^a	5,6^a	4^a	1,2^a
DP¹	77,0	73,0	66,1	52,7	73,8	49,6	41,7	18,4	8,4	12,6	2,3	2,4	2,4
Nim 1%													
62	264	295	165	131	283	199	114	61	30	32	12	8	0
1822	51	66	74	94	50	98	66	24	5	17	4	0	0
64	44	40	67	83	82	55	32	19	8	15	5	4	0
61	53	52	83	82	56	35	55	28	11	9	10	1	3
66	106	177	190	184	199	111	92	74	14	52	6	3	3
Média	103,6^a	126^a	115,8^a	114,8^a	134^a	99,6^a	71,8^a	41,2^a	13,6^a	25^a	7,4^a	3,2^a	1,2^a
DP	83,2	97,6	51,2	38,9	91,9	56,9	28,6	22,0	8,7	15,5	3,1	2,8	1,5
Nim 5%													
89	46	63	81	78	66	63	40	30	10	20	2	2	0
97	150	143	199	195	128	162	76	67	5	56	22	9	0
63	35	52	69	62	35	37	48	18	6	18	6	1	0
59	184	137	225	133	148	92	70	28	8	31	8	6	0
14A	115	65	85	160	91	103	55	38	11	19	9	0	0
Média	106^a	92^a	131,8^a	125,6^a	93,6^a	91,4^a	57,8^a	36,2^a	8^a	28,8^a	9,4^a	3,6^a	0^a
DP	57,9	39,5	66,2	49,7	40,9	42,2	13,4	16,7	2,3	14,4	6,7	3,4	0,0

¹Desvio padrão; Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem significativamente (P>0,05).

Tabela 3. Peso médio do total de teleóginas da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* recuperadas dos animais em experimentação distribuídos nos diferentes grupos.

Dias	Controle			Nim 1%			Nim 5%		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
- 3	63,7	369	0,172	90,5	359	0,252	73,53	382	0,192
- 2	59,4	303	0,196	76,6	413	0,185	61,49	307	0,200
- 1	55,9	285	0,196	65	330	0,196	42,15	226	0,186
+ 1	62,1	326	0,190	64,8	319	0,203	52,37	254	0,206
+ 2	63,1	317	0,199	70,6	353	0,200	45,65	227	0,201
+ 3	68,2	343	0,198	66,4	384	0,173	67,45	360	0,187
+ 4	100,4	485	0,207	105,3	525	0,200	71,22	382	0,186
+ 5	93,7	449	0,208	111,7	569	0,196	94,65	460	0,205
+ 6	106,3	579	0,183	122,1	582	0,209	104,17	522	0,199
+ 7	151,6	707	0,214	110,3	522	0,211	84,68	375	0,225
+ 8	107,4	523	0,205	81,5	376	0,216	59,64	263	0,226
+ 9	102,0	461	0,221	74,1	343	0,215	64,23	293	0,219
+ 10	88,	370	0,238	79,6	342	0,232	58,5	261	0,224
+ 11	103,4	457	0,226	120,2	518	0,231	127,22	530	0,240
+ 12	124,6	543	0,229	150,6	630	0,239	110,84	460	0,240
+ 13	95,4	487	0,195	150,9	579	0,260	149,17	659	0,226
+ 14	112,1	469	0,238	153,3	574	0,267	144,94	628	0,230
+ 15	126,5	548	0,230	160,1	670	0,238	108,87	468	0,232
+ 16	93,3	407	0,229	116,7	498	0,234	111,64	457	0,244
+ 17	73,9	346	0,213	83,3	359	0,232	67,91	289	0,234
+ 18	32,5	156	0,208	45,1	206	0,219	37,62	181	0,207
+ 19	12,1	76	0,159	11,4	68	0,167	11,11	40	0,277
+ 20	19,6	111	0,177	24,3	125	0,194	27,77	144	0,192
+ 21	5,8	28	0,21	6,9	37	0,187	7,79	47	0,165
+ 22	3,1	20	0,155	3,3	16	0,206	2,95	18	0,163
+23	1,2	6	0,2	1,1	6	0,178	0	0	0
Média	75,97 ^a	357 ^a	0,206 ^a	83,21 ^a	373 ^a	0,213 ^a	70,01 ^a	318 ^a	0,206 ^a
DP¹	42,95	195	0,02	49,29	204	0,02	43,14	186	0,05

A – Peso total das teleóginas recuperadas; B – Número de teleóginas; C – Peso médio das teleóginas

¹Desvio padrão; Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem significativamente (P>0,05).

O peso médio dos carrapatos não variou entre os grupos experimentais com média final de 2,32 mg para o grupo controle e de 2,37 para os grupos tratados com nim nas concentrações de 1 e 5%.

O peso médio das posturas dos carrapatos não variou estatisticamente entre os grupos experimentais. A média das posturas do grupo controle foi de 1,04 mg e para os grupos tratados com extratos de nim nas concentrações de 1 e 5%, a média obtida foi de 1,07 e 1,05, respectivamente.

Com o auxílio de microscópio estereoscópico, um total de 100 ovos era contado para avaliar o percentual de eclosão das larvas nos diferentes grupos experimentais. A taxa média de eclosão das larvas dos diferentes grupos experimentais ao longo dos vinte e três dias de observação encontra-se listada na (Tabela 6).

A eclosão do grupo controle variou de 55,5% no dia + 21 até 98,5% no dia + 19, com eclosão média de 85,5%. Para o grupo tratado com a formulação de nim na concentração de 1%, a variação nas taxas de eclosão nos diferentes dias experimentais foi menor, com média de eclosão de 86,2%. A taxa de eclosão do grupo tratado com 5% de nim foi menor, com média de 75,3%.

Tabela 4. Peso médio dos carrapatos da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* das duas repetições e das respectivas médias contendo 10 teleóginas, coletadas dos animais em experimentação distribuídos nos diferentes grupos experimentais.

Dias	Peso Médio de Teleóginas por Grupo								
	Controle			Nim 1%			Nim 5%		
	R1	R2	Média	R1	R2	Média	R1	R2	Média
- 3	2,185	2,175	2,18	2,411	2,317	2,364	2,271	2,321	2,296
- 2	1,928	2,208	2,068	2,369	2,264	2,3165	2,5	2,247	2,3735
- 1	2,685	2,211	2,448	2,417	2,34	2,3785	2,575	2,392	2,4835
+ 1	2,084	2,165	2,1245	2,478	2,429	2,4535	2,694	2,38	2,537
+ 2	1,982	2,261	2,1215	2,295	1,997	2,146	2,315	2,304	2,3095
+ 3	2,419	2,357	2,388	2,204	2,07	2,137	2,216	1,976	2,096
+ 4	2,308	2,299	2,3035	2,387	2,56	2,4735	2,472	2,204	2,338
+ 5	2,15	2,18	2,165	2,05	1,94	1,995	2,01	1,96	1,985
+ 6	2,23	2,19	2,21	2,27	2,41	2,34	2,08	2,25	2,165
+ 7	2,25	2,08	2,165	1,95	2,11	2,03	2,44	2,17	2,305
+ 8	2,35	2,08	2,215	2,01	2,52	2,265	2,22	2,34	2,28
+ 9	2,69	2,45	2,57	2,49	2,87	2,68	2,42	2,38	2,4
+ 10	2,67	2,89	2,78	2,79	2,83	2,81	2,79	2,76	2,775
+ 11	2,42	2,57	2,495	1,93	2,7	2,315	2,8	2,23	2,515
+ 12	2,59	2,66	2,625	2,54	2,93	2,735	2,43	2,55	2,49
+ 13	2,43	2,49	2,46	2,71	2,8	2,755	2,68	2,71	2,695
+ 14	2,77	2,76	2,765	2,85	2,59	2,72	3,17	3,03	3,1
+ 15	2,59	2,57	2,58	2,6	2,69	2,645	2,92	2,75	2,835
+ 16	3,01	2,91	2,96	2,87	2,17	2,52	3,07	2,76	2,915
+ 17	2,57	2,4	2,485	2,67	2,74	2,705	2,57	2,56	2,565
+ 18	2,03	2,04	2,035	2,06	2,44	2,25	2,17	2,48	2,325
+ 19	2,08	2,13	2,105	2,4	2,1	2,25	2,21	2,02	2,115
+ 20	2,5	2,43	2,465	2,5	2,35	2,425	2,46	2,31	2,385
+ 21	2,07	2,23	2,15	1,99	2,47	2,23	1,9	1,98	1,94
+ 22	2,07	2,23	2,15	1,99	2,47	2,23	1,9	1,98	1,94
+ 23	1,82	1,27	1,045	1,85	0,94	1,4	1,7	1,2	1,45
Média	2,35	2,33	2,32^a	2,34	2,39	2,37^a	2,41	2,32	2,37^a
DP	0,29	0,33	0,37	0,31	0,42	0,32	0,37	0,38	0,36

¹Desvio padrão; Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem significativamente (P>0,05).

Tabela 5. Peso médio das posturas das teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* nas duas repetições e das respectivas médias coletadas dos animais em experimentação distribuídos nos diferentes grupos.

Dias	Peso Médio de Postura por Grupo								
	Controle			Nim 1%			Nim 5%		
	R1	R2	Média	R1	R2	Média	R1	R2	Média
- 3	0,35	0,44	0,395	0,39	0,37	0,38	0,66	0,49	0,575
- 2	0,88	0,99	0,935	0,78	1,04	0,91	0,2	0,28	0,24
- 1	1,44	1,17	1,305	1,14	1,23	1,185	1,04	1,26	1,15
+ 1	1,07	1,11	1,09	1,42	1,22	1,32	1,38	1,22	1,3
+ 2	1	1,08	1,04	1,23	0,84	1,035	1,13	1,31	1,22
+ 3	1,25	1,1	1,175	0,74	0,71	0,725	0,87	0,79	0,83
+ 4	1,11	1,16	1,135	0,9	1,05	0,975	1,25	1,09	1,17
+ 5	1	0,92	0,96	0,66	0,78	0,72	0,85	0,99	0,92
+ 6	1,15	1,25	1,2	1,21	1,37	1,29	1,04	1,21	1,125
+ 7	1,34	1,19	1,265	1	1,15	1,075	1,29	1,22	1,255
+ 8	1,26	1,07	1,165	0,93	1,42	1,175	1,23	1,35	1,29
+ 9	1,45	1,26	1,355	1,28	1,63	1,455	1,23	1,33	1,28
+ 10	1,35	1,23	1,29	1,43	1,52	1,475	1,45	1,42	1,435
+ 11	1,18	1,31	1,245	1,12	1,48	1,3	1,39	0,96	1,175
+ 12	1,12	1,42	1,27	1,11	1,54	1,325	1,23	1,32	1,275
+ 13	0,99	0,87	0,93	1,38	1,57	1,475	1,11	1,33	1,22
+ 14	1,34	1,57	1,455	1,66	1,41	1,535	1,71	1,72	1,715
+ 15	1,42	1,44	1,43	1,51	1,59	1,55	1,68	1,45	1,565
+ 16	1,48	1,51	1,495	1,31	1,44	1,375	1,68	1,39	1,535
+ 17	1,39	1,27	1,33	1,52	1,55	1,535	1,39	1,47	1,43
+ 18	1	0,93	0,965	1,02	1,37	1,195	1,12	1,28	1,2
+ 19	0,65	0,29	0,47	0,21	0,3	0,255	0,41	0,4	0,405
+ 20	0,27	0,25	0,26	0,55	0,64	0,595	0,58	0,57	0,575
+ 21	0,8	0,48	0,64	0,35	0,51	0,43	0	0,21	0,105
+ 22	0,65	0,58	0,615	0,61	0,65	0,63	0	0,34	0,17
+ 23	0,2	0	0,1	0,55	0	0,275	0	0	0
Média	1,06	1,01	1,04^a	1,03	1,11	1,07^a	1,04	1,05	1,05^a
DP	0,34	0,41	0,37	0,39	0,46	0,41	0,50	0,45	0,47

¹Desvio padrão; Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem significativamente (P>0,05).

Tabela 6. Eclodibilidade das larvas da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em duas repetições e das respectivas médias a partir de 10 teleóginas coletadas dos animais em experimentação distribuídos nos diferentes grupos.

Dias	Eclodibilidade das larvas								
	Controle			Nim 1%			Nim 5%		
	R1	R2	Média	R1	R2	Média	R1	R2	Média
- 3	78	90	84	70	70	70	86	80	83
- 2	72	88	80	84	69	76,5	59	58	58,5
- 1	86	83	84,5	73	82	77,5	84	80	82
+ 1	91	66	78,5	89	95	92	97	94	95,5
+ 2	80	98	89	76	90	83	97	98	97,5
+ 3	96	98	97	96	96	96	86	94	90
+ 4	65	65	65	80	81	80,5	95	74	84,5
+ 5	86	97	91,5	91	88	89,5	79	73	76
+ 6	96	97	96,5	90	86	88	87	96	91,5
+ 7	94	94	94	88	82	85	95	96	95,5
+ 8	92	84	88	86	96	91	94	85	89,5
+ 9	98	93	95,5	58	69	63,5	82	62	72
+ 10	96	82	89	91	97	94	88	64	76
+ 11	70	99	84,5	93	98	95,5	85	93	89
+ 12	97	94	95,5	91	67	79	90	92	91
+ 13	94	91	92,5	91	100	95,5	62	27	44,5
+ 14	92	100	96	94	78	86	62	77	69,5
+ 15	92	94	93	80	96	88	85	97	91
+ 16	100	94	97	95	98	96,5	95	89	92
+ 17	99	91	95	96	97	96,5	93	96	94,5
+ 18	54	89	71,5	92	94	93	90	74	82
+ 19	97	100	98,5	91	95	93	75	18	46,5
+ 20	84	98	91	87	68	77,5	95	72	83,5
+ 21	81	30	55,5	86	84	85	49	62	55,5
+ 22	81	95	88	82	89	85,5	0	49	24,5
+ 23	48	0	24	98	0	49	0	0	0
Média	86,2	84,7	85,5^a	87,9	84,5	86,2^a	77,4	73,1	75,3^a
DP	14,1	23,8	16,9	8,39	20,54	11	26,8	26,5	24,7

¹Desvio padrão; Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem significativamente (P>0,05).

Os resultados descritos por Benavides et al. (2001) são superiores ao presente estudo ao utilizarem 5% de extrato aquoso de nim a cada vinte e um dias em bovinos naturalmente infestados onde relataram eficácia similar ao grupo tratado com amitraz.

Os resultados relatados por Valente et al. (2007) também são superiores ao presente estudo ao utilizarem extratos de nim no controle de bovinos naturalmente infestados com o carrapato *Rhipicephalus (B.) microplus*, embora os autores tenham utilizado folhas da planta e preparado a solução usada através de aspersão na hora dos tratamentos, uma vez que foram realizados tratamentos semanais por um período de um mês. Sendo assim, o número de tratamentos comparados ao presente trabalho foi muito maior e o fato dos autores desconhecerem a concentração empregada no tratamento dos animais.

Kaaya et al. (2007) também relataram a eficácia do óleo de nim, utilizando-o no controle de *Amblyomma variegatum* em caprinos e em coelhos, e de *A. variegatum*, *Rhipicephalus appendiculatus* e *Boophilus decoloratus* em bovinos. Em seus estudos, o período de fixação no hospedeiro e de muda foram significativamente maiores nos animais tratados. Ao utilizarem uma formulação spray contendo óleo de nim a 25%, obtiveram resultados semelhantes aos do presente estudo, reduzindo por até cinco dias o número de carrapatos das espécies *A. variegatum*, *R. appendiculatus* e *B. decoloratus* em bovinos.

Os resultados do trabalho também são inferiores aos relatados por Srivastava et al. (2008), que ao administrar extratos de nim na concentração de 8%, através de teste *in vivo*, em bezerros obtiveram eficácia de 70% até o dia +5 de experimentação. As teleóginas que foram coletadas ao final do período experimental que não morreram em virtude do contato com o produto, apresentaram diminuição em todos os parâmetros como peso da teleóginas, postura e percentual de eclosão, que no presente estudo praticamente não sofreram alteração.

Conforme comentado anteriormente, diferentes metodologias são empregadas, sobretudo na realização de teste *in vivo*. Os resultados do trabalho desenvolvido por Srivastava et al. (2008) diferem inclusive dos efeitos relatados na literatura, uma vez que o nim não possui atividade adulticida, exceto quando aplicados em altas concentrações, o que não foi verificado.

Os resultados descritos por Webb e David (2002) que utilizaram extratos de nim a 5% no controle de carrapatos de bovinos naturalmente infestados e mantidos a campo, através da aplicação de banhos semanais contendo o produto, são similares ao presente estudo. Entretanto, o presente estudo empregou infestações artificiais, de maneira que todos os animais da experimentação foram submetidos ao mesmo desafio.

Borges et al. (2005) utilizaram extrato alcoólico de *M. azedarch* em um experimento, oito bezerros divididos em dois grupos, infestados artificialmente com larvas de *Rhipicephalus (B.) microplus*. Os resultados são similares ao presente estudo ao comparar o número de teleóginas recuperadas nos grupos tratados que foi inferior ao grupo controle, no presente estudo apenas na maior concentração. Outros parâmetros utilizados como peso médio das teleóginas e percentual de ecdise não sofreram alterações entre os grupos controle e tratados resultados similares nos dois trabalhos.

Os resultados do presente estudo indicam que o extrato aquoso de nim na concentração de 5%, contrariando os dados da literatura, interferiu no desenvolvimento do carrapato sobre os animais, uma vez que o número total de carrapatos recuperados foi menor em relação ao grupo controle. Porém, não foi observado interferências nos aspectos reprodutivos das teleóginas, fato esperado devido à literatura consultada. Com eficácia de apenas 10,3 e 14,2% para os extratos de nim nas concentrações de 1 e 5% respectivamente é possível afirmar que as soluções em teste não são eficazes no controle do carrapato *Rhipicephalus (B.) microplus*.

CAPÍTULO III

**EFICÁCIA DO NIM (*Azadirachta indica*) NO CONTROLE DE
Rhipicephalus sanguineus (LATREILLE, 1806) (ACARI: IXODIDAE)**

RESUMO

Rhipicephalus sanguineus é um carrapato heteroxeno que pode parasitar diversos hospedeiros domésticos e silvestres, inclusive o homem, embora tenha o cão como hospedeiro preferencial, sendo responsável por inúmeros prejuízos aos seus hospedeiros, seja de forma direta ou indireta. O presente trabalho foi realizado com objetivo de avaliar a eficácia do nim, em diferentes concentrações, através de testes *in vitro* e *in vivo* no controle dos estágios evolutivos de *R. sanguineus*. No teste *in vitro*, o peso médio das fêmeas ingurgitadas e suas respectivas posturas foram similares em todos os grupos experimentais. Porém, o percentual de eclosão no grupo tratado com a concentração de 10% foi de apenas 26,6%. Ao utilizar o nim nas concentrações de 2, 5 e 10% ainda em teste *in vitro* em fêmeas ingurgitadas, a eficácia encontrada foi de 4,1; 35,6 e 72,5%, respectivamente. Já nos teste *in vivo*, o nim na concentração de 2% foi ineficaz no controle de larvas, ninfas e adultos, com eficácias de 24,6; 18,3 e 11,9, respectivamente, enquanto nas concentrações de 5%, as eficácias foram de 56,46; 41,36 e 29,9% para larvas, ninfas e adultos. O nim na concentração de 10% apresentou melhores índices de eficácias para ninfas, 56,07% e adultos, 44,8%, quando comparados aos demais grupos experimentais, causando ainda um menor percentual de eclosão de larvas, 58,2%. Os resultados dos testes *in vivo* demonstram baixa eficácia do nim no controle de *R. sanguineus* independente da concentração utilizada. Ainda através dos resultados encontrados, foi possível observar que o estágio de larva foi o mais sensível, seguido pelo de ninfas e adultos. O nim na concentração de 10% causou um menor percentual de eclosão de larvas do carrapato *R. sanguineus* através de testes *in vivo*.

Palavras-chave: *Rhipicephalus sanguineus*; Carrapatos; Controle; Nim; Biopesticida

ABSTRACT

Rhipicephalus sanguineus is a heteroxenous tick which parasitizes various domestic and wild animals, and even the man. The dog is the preferred host, being directly and indirectly affected by this parasite. The objective of the present study was to evaluate the efficacy of neem in different concentrations on the control of *R. sanguineus* stages through *in vitro* e *in vivo* assays. In the *in vitro* test, the mean weight of engorged females and their respective oviposition were similar in all experimental groups. However the mean hatching rate for 10% neem was only 26.6%. Also in the *in vitro* test efficacy rates of 4.1, 35.6, and 72.5% were found for 2, 5 and 10% neem extracts, respectively, against engorged females. Whereas in the *in vivo* tests 2% neem was inefficacious on the control of larvae, nymphs and adults, with efficacies of 24.6, 18.3, and 11.9%, respectively. For 5% neem, efficacies were 56.46, 41.36, and 29.9% for larvae, nymphs and adults, respectively. The 10% neem treatment presented higher efficacy rates for nymphs, 56.07% and adults, 44.4%, when compared to the other groups; and caused a lower larval hatching rate, 58.2%. The results of *in vivo* assays demonstrated a low efficacy of neem on the control of *R. sanguineus* regardless the used concentration. It was also observed that larval stage is the most sensitive, followed by nymphs and adults. The 10% neem formulation caused a lower larval hatching rate in *R. sanguineus* ticks through the *in vivo* assay.

Keywords: *Rhipicephalus sanguineus*; Ticks; Control; Neem; Biopesticide

1 INTRODUÇÃO

Os carrapatos da família Ixodidae possuem em seu desenvolvimento quatro estágios bem definidos: ovo, larva, ninfa e adulto. Larvas e ninfas requerem sangue para que ocorra o processo de muda e as fêmeas para o processo de oviposição, caracterizando a importância de todas as fases evolutivas para seus hospedeiros.

Originário da África, *Rhipicephalus sanguineus* é um carrapato com ampla distribuição geográfica que encontrou no Brasil, temperatura e umidade ideais para seu desenvolvimento, sendo encontrado em ambientes rurais e urbanos. Foi introduzido nas Américas durante a colonização européia a partir do final do século XV (LABRUNA, 2004). Considerado carrapato heteroxeno, necessita de três hospedeiros para completar seu ciclo biológico, tornando-o importante vetor, pode parasitar diversos hospedeiros domésticos e silvestres, inclusive o homem, embora tenha o cão como hospedeiro preferencial. Por esse motivo é denominado carrapato dos canis, também conhecido como carrapato marrom ou vermelho do cão.

O carrapato pode causar diversos problemas nos animais seja de forma direta, pois quando em grandes infestações pode levar o hospedeiro a apresentar anemia, alterações comportamentais como também, é hospedeiro intermediário de diversos agentes patogênicos, tais como: *Rickettsia conorii*, *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis* e *Babesia canis* (OTRANTO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2008), *R. rickettsii* (PIRANDA et al., 2006; DANTAS-TORRES, F., 2006; DANTAS-TORRES, F., 2008), *Borrelia* sp., agente etiológica da doença de Lyme (DANTAS-TORRES, F., 2006), sendo ainda suspeito na transmissão de *Leishmania* spp. (COUTINHO et al., 2005). Tem hábitos nidícolas, além de possuir geotropismo negativo, características importantes para implantação de um efetivo sistema de controle.

Ao longo dos últimos anos observou-se um grande avanço no desenvolvimento de novos compostos que se prestam ao controle de ectoparasitos de cães e gatos. Dentre os grupamentos químicos mais empregados atualmente no controle de ectoparasitos em pequenos animais encontram-se os carbamatos, organofosforados, os piretróides, as amidinas, as lactonas macrocíclicas e os fenilpirazóis, com modos de ação e eficácia distintos.

O uso indiscriminado de produtos químicos, associado à contaminação do meio ambiente e seu potencial de intoxicação para a saúde de animais e humanos e o fato do surgimento de populações resistentes a determinados produtos químicos, fez com que despertasse o interesse de alguns pesquisadores para a utilização de um controle biológico, incluindo nematódeos predadores, fungos e a utilização de fitoterápicos, plantas medicinais (DAS, 1996; LANS et al., 2000; ZAIM et al., 2002; MUMCUOGLU et al., 1996). O emprego dos fitoterápicos vem aumentando vertiginosamente, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), onde 85% da população dos Estados Unidos usam frequentemente.

O objetivo do trabalho foi avaliar a eficácia de diferentes concentrações de nim no controle de larvas, ninfas e adultos de *R. sanguineus* através de testes *in vitro* e *in vivo*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Muitos trabalhos relatam a eficácia dos produtos químicos no controle dos diferentes estágios do carrapato *R. sanguineus*. O uso de biopesticidas vem despertando o interesse de alguns grupos de pesquisa. Entretanto, diferentes plantas e metodologias tem sido aplicadas, com diferentes concentrações, diferentes estágios do carrapato, além de diferentes partes da planta e os diferentes métodos de obtenção dos princípios ativos, levando a diferentes níveis de eficácia.

Em 2006, Pires et al. utilizaram extratos aquosos e etanólicos da planta *Simarouba versicolor* em larvas não alimentadas. Independente da concentração do extrato etanólico utilizado foi obtido uma eficácia de 100% no controle das larvas não alimentadas. Já nos extratos aquosos a eficácia variou de 70 a 100% dependendo da concentração utilizada.

Soares et al. (2006) utilizando extratos obtidos de frutos maduros e verdes da planta *Melia azedarach*, além do extrato de folhas da mesma planta sobre larvas e teleóginas de *R. sanguineus* obtiveram eficácia proporcionais a concentração utilizada, com o uso a partir de frutos maduros, pois no emprego a partir de frutos verdes não foi observado eficácia do fitoterápico. Ao empregarem sobre fêmeas ingurgitadas os resultados descritos são de apenas 50%.

Bernardes Júnior et al. (2006) não obtiveram eficácia no controle do carrapato *R. sanguineus* ao empregarem extratos da planta *M. azedarach* em ovos oriundas de fêmeas ingurgitadas coletadas diretamente de seus hospedeiros, obtendo percentual de eclosão das larvas entre 53,18 e 89,25%, dependendo da concentração empregada.

Em 2007, Farias et al. empregaram através de teste de imersão extratos da planta *Carapa guianensis* nas concentrações de 10; 25; 30; 50 e 100%, no controle de fêmeas ingurgitadas das espécies *Anocentor nitens* e *R. sanguineus*. Em todas as concentrações testadas a eficácia para ambas as espécies foi de 100%, uma vez que a maioria das fêmeas ingurgitadas morreu após o contato com o produto e um pequeno grupo de carrapatos sobreviventes realizou postura de ovos inférteis. Os mesmos resultados foram relatados por Ribeiro et al. (2008) quarenta e oito horas após a utilização do extrato da planta *D. brasiliensis* no controle de larvas de *R. sanguineus* através de testes *in vitro*.

Outro biopesticida que vem sendo empregado no controle de diversos parasitos são os extratos oriundos da planta *Azadirachta indica*. Choudhury (2001) empregou óleo de nim nas concentrações 20; 40; 60; 80 e 100% no controle de larvas não alimentadas, com intervalos compreendidos entre 2 e 8 horas de observação, foi descrito eficácia de 100% no controle do carrapato.

Silva et al. (2007) relataram alterações causadas pelo emprego do nim no controle de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *R. sanguineus* através de testes *in vitro*, alterando o período de pré-postura, postura e massa total de ovos produzidas para ambas as espécies. Entretanto, a eficácia no controle dessas espécies de carrapato foi de 30,0 e 26,3% para *Rhipicephalus (B.) microplus* e *R. sanguineus* respectivamente.

Alwin et al. (2007) empregaram o óleo de nim no controle de larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus*. Oitenta e quatro horas após a aplicação do produto foi observada uma mortalidade de 45% de adultos e 90% de larvas.

Segundo a literatura, alguns produtos estão sendo desenvolvidos a partir da associação de mais de um extrato de plantas. Em 1995, Tripathy et al. utilizaram um produto comercial composto por extratos das plantas *A. indica*, *Cedrus deodara* e *E. ribes* em testes *in vitro* e *in vivo* no controle de cães naturalmente infestados com *R. sanguineus*. Os autores relataram

uma eficácia de 100% em ambos os testes vinte e quatro horas após os carrapatos entrarem em contato com a formulação em teste.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Avaliação da eficácia do Nim em testes *in vitro* para *Rhipicephalus sanguineus*

Foi utilizada a emulsão de nim, a partir do óleo de nim puro, adquirido do laboratório Natural Rural®. Para o preparo da emulsão foi acrescentado a uma parte do óleo, tween 80 (emulsificante) na concentração de 30%. Posteriormente, a solução foi levada a um agitador magnético com aquecimento, onde permanecia por 10 minutos a uma temperatura de 40° C, completando até a quantidade desejada com água.

Foram coletadas diretamente de seus hospedeiros 120 fêmeas ingurgitadas da espécie *R. sanguineus*, oriundas de uma colônia mantida nas dependências do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, utilizando coelhos como hospedeiros. As fêmeas ingurgitadas foram previamente lavadas, pesadas e distribuídas em placas de Petri de maneira que seus pesos fossem semelhantes. As fêmeas ingurgitadas foram separadas em quatro grupos com três repetições cada: Grupo 1, grupo sem tratamento, grupo controle. Grupo 2, tratado com emulsão de nim na concentração de 2%. Grupo 3, tratado com a emulsão de nim na concentração de 5% e finalmente grupo 4 onde foi aplicado o produto na concentração de 10%. Os testes de imersão seguiram a metodologia proposta por Drummond et al. (1973), onde os carrapatos são imersos por um período de 5 minutos nas formulações em teste e o grupo controle foi imerso em água.

Os carrapatos foram secos fixados utilizando fita dupla-face e colocados em estufas tipo BOD a uma temperatura de 27°C e umidade relativa superior a 80%. A leitura de postura foi feita 15 dias após o tratamento e a eclodibilidade foi avaliada após 45 dias. A eficácia das formulações foi avaliada através da comparação do índice de eficiência reprodutiva IER = peso dos ovos/peso das fêmeas x 20000 x % eclodibilidade e a eficiência carrapaticida EC = (IER controle – IER tratamento)/IER controle x 100. A análise estatística foi feita através do teste de χ^2 e para comparação entre as médias o teste de Kruskal-Wallis.

3.2.1 Avaliação da eficácia do Nim em testes *in vivo* para *Rhipicephalus sanguineus*

Todas as etapas do ensaio *in vivo* foram realizadas nas dependências do Laboratório (LQEPV). Foram utilizados 24 coelhos com média de três meses idade, alimentados exclusivamente com ração e água *ad libitum*, para cada ensaio. Os coelhos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos com seis animais cada. No dia zero, os animais do grupo 1 foram mantidos sem tratamento, grupo controle. Os animais pertencentes ao grupo 2 foram tratados com nim na concentração de 2%, enquanto que o grupo 3 foi tratado com o produto na concentração de 5%. Já o grupo 4, foi tratado com a formulação em teste contendo 10% de nim.

Foi utilizada a emulsão de nim, a partir do óleo de nim puro, adquirido do laboratório Natural Rural®. Para o preparo da emulsão foi acrescentado a uma parte do óleo, tween 80 (emulsificante) na concentração de 30%. Posteriormente, a solução foi levada a um agitador magnético com aquecimento, onde permanecia por 10 minutos a uma temperatura de 40° C, completando até a quantidade desejada com água. A dose empregada em cada coelho foi de 3 ml/kg de peso vivo, utilizando um borrifador para aspersão do produto em todo o animal, inclusive os condutos auditivos.

No dia +1, seguindo a metodologia de Neitz et al. (1971) utilizada para manutenção de colônia, foi colocado um saco de pano aderido à base das orelhas do coelho. No dia +2,

foram realizadas as infestações com os carrapatos não alimentados de cada estágio, oriundos de uma colônia localizada nas dependências do mesmo laboratório, sendo o local de escolha para as infestações a região entre as orelhas. Todas as infestações referentes a cada estágio do parasito foi realizada em etapas distintas. No ensaio utilizando larvas, cada coelho foi infestado com 2500 larvas não alimentadas. No ensaio utilizando ninfas, cada coelho foi infestado com 200 carrapatos não alimentados. Já o ensaio com adultos, cada coelho foi infestado com 25 casais não alimentados de *R. sanguineus*.

Foram realizadas observações diárias nos animais para avaliar a fixação dos carrapatos, reações adversas do produto, mortalidade dos carrapatos e coleta dos carrapatos ingurgitados. Após a queda de todos os carrapatos, os mesmos foram separados em seringas de maneira que os carrapatos de cada animal não tivessem contato com os animais do mesmo grupo. As seringas após a devida identificação eram então acondicionadas em câmaras climatizadas com demanda bioquímica de oxigênio a uma temperatura média de 27 °C e umidade relativa de 80%.

Ao final de vinte e cinco dias de avaliação, a avaliação da eficácia foi calculada com a seguinte fórmula: $[(\text{Total das ninfas / adultos recuperados do grupo controle} - \text{Total das ninfas / adultos recuperados do grupo tratado}) \div \text{Total das ninfas / adultos recuperados do grupo controle}] \times 100$.

As fêmeas ingurgitadas coletadas de cada grupo foram pesadas e acondicionadas em placas de Petri, onde permaneceram no mesmo ambiente das larvas e ninfas por vinte e um dias. Após esse período, foram pesadas as respectivas posturas, onde após trinta dias, foi avaliado a eclodibilidade de cada postura com auxílio de microscópio estereoscópico. Para avaliação da eficácia dos adultos, foi calculada a eficiência reprodutiva de cada grupo experimental através da fórmula $\text{IER} = \text{peso dos ovos/peso das fêmeas} \times 20000 \times \% \text{ eclodibilidade}$, onde foi calculada posteriormente o índice de eficiência carrapaticida, através da fórmula $\text{EC} = (\text{IER controle} - \text{IER tratamento}) / \text{IER controle} \times 100$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Testes *in vitro*

Os resultados do teste *in vitro* utilizando diferentes concentrações de nim, em fêmeas ingurgitadas coletadas diretamente dos hospedeiros encontram-se listados na Tabela 1. Entre os parâmetros utilizados e expressos na tabela estão o peso médio das fêmeas ingurgitadas, as posturas e os percentuais de eclosão, que permitiram o cálculo dos índices de eficiência reprodutiva, utilizados para os cálculos de eficácia das formulações em teste.

O peso médio das fêmeas ingurgitadas do grupo controle foi de 1,415 g, enquanto que nos grupos tratados com extratos de nim nas concentrações de 2, 5 e 10% foram de 1,429; 1,349 e 1,379 respectivamente. Após quinze dias, a massa de ovos de cada grupo foi pesada evidenciando peso médio similar entre os grupos, uma vez que o grupo controle apresentou peso médio de postura de 0,690; o grupo tratado com a concentração 2% com 0,670; o grupo tratado com 5% com 0,630 e o grupo tratado com a concentração de 10% apresentou peso médio de postura no valor de 0,687.

O percentual de eclosão do grupo controle e do grupo tratado com extrato de nim na concentração de 2 % foi de 100%. No grupo tratado com nim na concentração de 5%, o percentual médio de eclosão foi de 66,6%. Já no grupo tratado com extrato de nim na concentração de 10%, apenas 26,6 das larvas foram visualizadas.

Os dados referentes à eficácia carrapaticida das formulações em teste encontram-se listados na Figura 1.

A eficácia observada no grupo tratado com a formulação contendo 2% de nim foi de apenas 4,1% e de 35,6% no grupo tratado com 5% de nim. Já no grupo tratado com a formulação contendo 10% de extrato de nim, a eficácia foi de 72,5%. Os valores observados no grupo tratado com a formulação contendo 10% de extrato de nim são muito superiores aos demais grupos, entretanto, são inferiores ao compararmos com as formulações convencionais disponíveis no mercado.

Trabalhos na literatura consultada descrevem o uso do biopesticida nim no controle de *R. sanguineus* através de testes *in vitro*. Choudhury (2001) empregou óleo de nim nas concentrações 20; 40; 60; 80 e 100% no controle de larvas não alimentadas, com intervalos compreendidos entre duas e oito horas de observação, relatou eficácia de 100% no controle do carrapato, resultados superiores ao presente estudo, embora o extrato, as concentrações e a fase parasitária do carrapato tenham sido diferentes.

Silva et al. (2007) utilizaram extratos de duas plantas: *A. indica* e *C. citratus* no controle de *R. sanguineus* através de testes de imersão de fêmeas ingurgitadas. Os resultados descritos pelos autores são inferiores ao presente estudo, ao comparar com os resultados de ambos fitoterápicos. Ao utilizarem extratos de *C. citratus*, a eficácia foi de 52,1% e a do nim foi de apenas 26,3%. Embora os resultados do presente estudo tenham sido superiores, a comparação, principalmente com o nim foi prejudicada, pois os autores não relataram a concentração utilizada no experimento.

Tabela 1. Peso das fêmeas ingurgitadas, das posturas, percentual de eclosão e índices de eficiência reprodutiva do *Rhipicephalus sanguineus* nos grupos controle e tratados nas diferentes concentrações de nim.

Grupos/ Repetições	Peso Fêmeas (g)	Peso Postura (g)	% Eclosão	IER
Controle				
1	1,320	0,611	100	925757,6
2	1,354	0,686	100	1013294
3	1,570	0,774	100	985987,3
Média	1,415	0,690	100	975012,9
Nim 2%				
1	1,310	0,610	100	931297,7
2	1,359	0,613	100	902133,9
3	1,620	0,787	100	971604,9
Média	1,429	0,670	100	935012,2
Nim 5%				
1	1,309	0,565	60	517952,6
2	1,350	0,682	80	808296,3
3	1,389	0,645	60	557235,4
Média	1,349	0,630	66,6	627828,1
Nim 10%				
1	1,307	0,690	20	211170,6
2	1,451	0,705	30	291523,1
3	1,379	0,688	30	299347,4
Média	1,379	0,687	26,6	267347

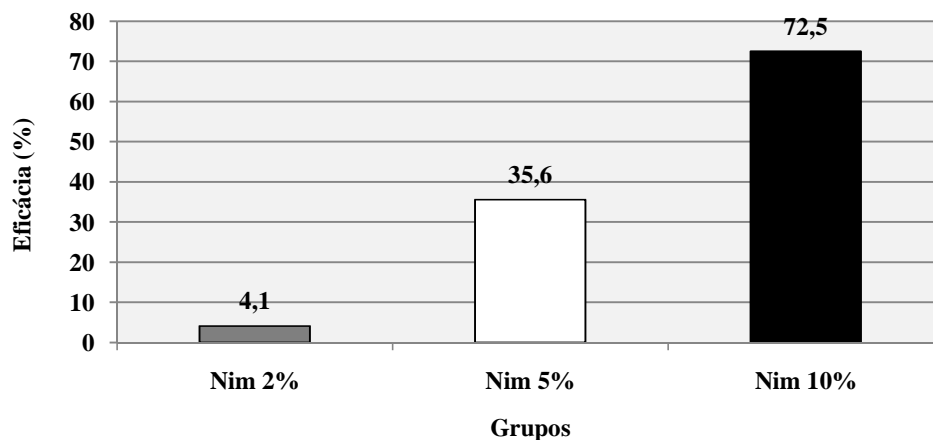


Figura 1. Eficácia carrapaticida das diferentes concentrações de nim em fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* em teste *in vitro*.

Alwin et al. (2007) utilizaram com sucesso o óleo de nim puro ou associado a cânfora com resultados superiores ao presente estudo uma vez que 72 horas após o tratamento, 50% das fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* estavam mortas pela ação do produto, fato não observado no presente estudo. Os autores ainda relataram que o nim inibiu em 100% a eclosão das larvas, resultados melhores que o presente estudo onde a taxa média de eclosão foi de 26,6%.

Outras plantas já foram empregadas no controle de *R. sanguineus*. Pires et al. (2006) utilizaram extratos aquosos e etanólicos da planta *Simarouba versicolor* em larvas não alimentadas. Independente da concentração do extrato etanólico utilizado foi obtido uma eficácia de 100% no controle das larvas não alimentadas. Já nos extratos aquosos a eficácia variou de 70 a 100% dependendo da concentração utilizada. Os resultados do presente estudo são inferiores aos relatados pelos autores, embora tenham sido utilizados extratos de plantas distintas e fases parasitárias diferentes. Os mesmos autores em outro trabalho desenvolvido no mesmo ano a partir das mesmas concentrações do extrato da planta *S. versicolor* utilizando em fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* com o único objetivo de avaliar a inibição da postura dos carrapatos. Os resultados obtidos são semelhantes aos comparados aos do presente estudo ao comparar os extratos aquosos, pois em ambos os ensaios não houve inibição na postura dos carrapatos. No presente estudo, foi observado apenas um menor percentual de eclosão, ao comparar com o grupo controle e no estudo de Pires et al. (2006b) o percentual de eclosão não foi avaliado.

Soares et al. (2006) utilizando extratos obtidos de frutos maduros e verdes da planta *M. azedarach*, além do extrato de folhas da mesma planta sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* obtiveram eficácia proporcionais a concentração utilizada, com o uso a partir de frutos maduros, pois no emprego a partir de frutos verdes não foi observado eficácia do fitoterápico. Ao empregarem sobre fêmeas ingurgitadas os resultados são inferiores ao presente estudo, pois os autores relataram eficácia de 50%, enquanto no presente estudo a eficácia foi superior a 70%. Os autores relataram que os achados da eficácia foram inferiores aos observados no controle de *Rhipicephalus (B.) microplus* afirmando, diferentemente do presente estudo, que *R. sanguineus* é mais resistente ao uso do fitoterápico do que *Rhipicephalus (B.) microplus*. No presente estudo ao comparar os resultados *in vitro* do uso de *A. indica* verificamos que os melhores níveis de eficácia foram obtidos no controle de *R. sanguineus*.

Bernardes Júnior et al. (2006) não obtiveram eficácia no controle do carrapato *R. sanguineus* ao empregarem extratos da planta *M. azedarach* em ovos oriundas de fêmeas ingurgitadas coletadas diretamente de seus hospedeiros. Embora tenham sido empregadas diversas diluições, em todos os grupos tratados, houve percentual de eclosão das larvas entre 53,18%, grupo tratado com a maior concentração e 89,25%, referente ao grupo controle. Diferentemente, Ribeiro et al. (2008) empregaram com sucesso o extrato da planta *D. brasiliensis* no controle de larvas de *R. sanguineus* obtendo 100% de eficácia quarenta e oito horas após a utilização do produto através de testes *in vitro*.

Resultados superiores ao presente estudo, foram obtidos por Farias et al. (2007) quando empregaram através de teste de imersão extratos da planta *Carapa guianensis* nas concentrações de 10; 25; 30; 50 e 100%, no controle de fêmeas ingurgitadas das espécies *A. nitens* e *R. sanguineus*. Em todas as concentrações testadas a eficácia para ambas as espécies foi de 100%, uma vez que a maioria das fêmeas ingurgitadas morreu após o contato com o produto e um pequeno grupo de carrapatos sobreviventes realizou postura de ovos inférteis.

4.2 Testes *in vivo*

4.2.1 Larvas

O número de larvas ingurgitadas recuperadas de cada coelho por dia de experimentação, nos diferentes grupos encontram-se listados na Tabela 2.

A média de recuperação das larvas ingurgitadas foi similar nos grupos tratados, ocorrendo maior recuperação nos dias + 4 e + 5. Para efeitos comparativos, foi utilizados os valores médios de recuperação dos grupos, uma vez que um animal do grupo tratado com a formulação contendo 10% de nim veio a óbito.

O percentual de recuperação, o número de larvas ingurgitadas dos carrapatos que realizaram ecdise para ninfa, dos grupos controle e tratados encontram-se listados na Tabela 3. Das 2500 larvas não alimentadas utilizadas na infestação em cada animal, o percentual de recuperação do grupo controle foi de 39,172%, com a recuperação de 979,3 carrapatos. O percentual de recuperação do grupo tratado com a formulação na concentração de 2% foi de 31,432 o que representa um total de 785,8 carrapatos recuperados. Os melhores resultados foram observados ao empregar a concentração de 5% uma vez que o percentual de recuperação foi de apenas 27,864 equivalente a 696,6 carrapatos. Já no grupo tratado com a concentração de 10%, os valores médios de recuperação foram de 35,208 com uma média de recuperação de 880,2 larvas ingurgitadas.

Do total de larvas ingurgitadas recuperadas dos diferentes grupos experimentais e que ao longo do período experimental realizaram ecdise para ninfas, o grupo controle foi o que apresentou melhores resultados, com a recuperação média de ninfas de 793. No grupo tratado com 2% de nim, foram recuperadas uma média de 597,7 ninfas.

Os piores percentuais de recuperação de ninfas foram observados no grupo tratado com a formulação contendo 5% de nim com um total de 2071 ninfas, média de 345,2. O grupo tratado com 10% teve percentual de recuperação média de 35,208, representando uma média de 513,2 ninfas de *R. sanguineus*. Os níveis de eficácia média calculados a partir do número de ninfas recuperadas nos diferentes grupos experimentais estão descritos na Figura 2.

Os melhores resultados de eficácia foram observados após a utilização do extrato de nim na concentração de 5% com eficácia média de 56,46%, seguido pelo grupo tratado na concentração de 10% com eficácia de 35,28 e finalmente pelo grupo tratado na concentração de 2%, onde a eficácia observada foi de apenas 24,62%.

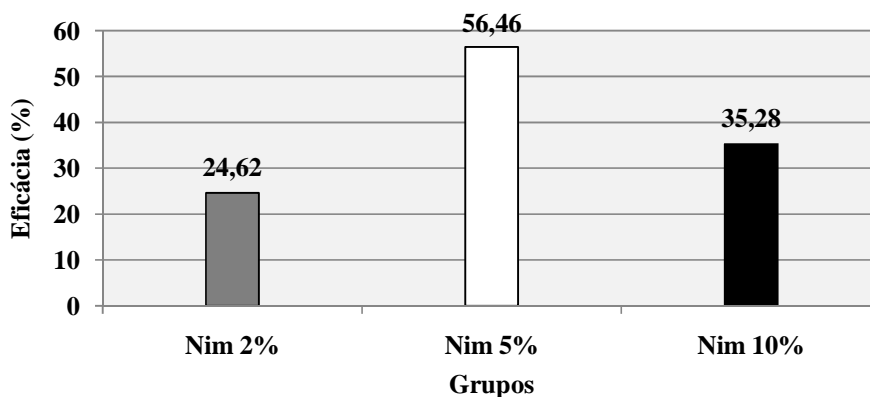


Figura 2. Eficácia carrapaticida do nim nas diferentes concentrações no controle de larvas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, em teste *in vivo*.

Tabela 2. Número de larvas ingurgitadas recuperadas de *Rhipicephalus sanguineus* em coelhos infestados artificialmente nos diferentes dias e grupos experimentais.

Grupo/ Animais	Número de Larvas Recuperadas				
	Dia + 3	Dia + 4	Dia + 5	Dia + 6	Total
Controle					
01	6	112	176	138	432
02	21	602	774	154	1551
03	8	148	556	89	801
04	8	146	574	76	804
05	84	348	639	164	1235
06	206	434	310	106	1056
Média ± DP¹	55,5 ±72,6	298,3 ±179,6	504,8 ±201,6	121,2 ±32,9	979,3^a ±355,9
Nim 2%					
07	1	8	34	12	55
08	5	67	141	87	300
09	18	290	617	67	992
10	5	189	575	67	836
11	0	147	949	227	1323
12	22	207	784	196	1209
Média ± DP	8,5 ±8,4	151,3 ±92,6	516,7 ±328,1	109,3 ±76,3	785,8^a ±462,4
Nim 5%					
13	113	530	495	90	1228
14	60	265	406	45	776
15	10	300	224	197	731
16	2	42	150	31	225
17	22	150	825	37	1034
18	2	93	0	91	186
Média ± DP	34,8 ±40,2	230 ±161,6	350 ±267,1	81,8 ±56,8	696,6^a ±384,5
Nim 10%					
19	78	328	173	40	619
20	Óbito	Óbito	Óbito	Óbito	Óbito
21	177	336	301	84	898
22	175	587	195	103	1060
23	246	260	438	107	1051
24	7	160	435	171	773
Média ± DP	136,6 ±84	334,2 ±141,3	308,4 ±113,2	101 ±42,3	880,2^a ±168,2

¹Desvio padrão; Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem significativamente (P>0,05).

Tabela 3. Número de larvas ingurgitadas, percentual de recuperação e ninfas não alimentadas recuperadas de *Rhipicephalus sanguineus* recuperadas em coelhos infestados artificialmente nos diferentes grupos experimentais.

Grupos/Animais	N⁰ Larvas Recuperadas	Percentual de Recuperação	N⁰ ninfas Recuperadas
Controle			
01	432	17,28	330
02	1551	62,04	1209
03	801	32,04	672
04	804	32,16	664
05	1235	49,4	1023
06	1056	42,24	860
Média ± DP¹	979,3	39,172	793^a ± 281,7
Nim 2%			
07	55	2,2	34
08	300	12	193
09	992	39,68	813
10	836	33,44	667
11	1323	52,92	973
12	1209	48,36	906
Média ± DP	785,8	31,432	597,7^a ± 357,9
Nim 5%			
13	1228	49,12	796
14	776	31,04	270
15	731	29,24	322
16	225	9	138
17	1034	41,36	471
18	186	7,44	74
Média ± DP	696,6	27,864	345,2^a ± 238,6
Nim 10%			
19	619	24,76	397
20	Óbito	Óbito	Óbito
21	898	35,92	611
22	1060	42,4	735
23	1051	42,04	646
24	773	30,92	177
Média ± DP	880,2	35,208	513,2^a ± 201,5

¹Desvio padrão; Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem significativamente (P>0,05).

4.2.2 Ninfas

O número de ninfas ingurgitadas recuperadas de cada coelho por dia de experimentação, nos diferentes grupos encontram-se listados na Tabela 4. A média de recuperação das ninfas ingurgitadas por dia de experimentação foi maior no dia + 4, seguido pelo dia + 5 e pelo dia +3, em todos os grupos experimentais. O número total de ninfas ingurgitadas dos carrapatos da espécie *R. sanguineus* infestados artificialmente em coelhos, nos diferentes grupos experimentais, bem como o percentual de recuperação e o número de adultos obtidos no final do período experimental encontram-se descritos na Tabela 5.

O percentual médio de recuperação das ninfas no grupo controle foi de 75,3%, representando um número médio de ninfas ingurgitadas recuperadas 150,7. No grupo tratado com o produto na concentração de 2%, o percentual médio de recuperação foi de 50,75%, representando um número médio de carrapatos de 101,5. Os melhores resultados obtidos foram encontrados ao empregar o produto na concentração de 5%, onde o percentual médio de recuperação foi de apenas 32,42% o que equivale a uma média de 64,8 carrapatos por animal por grupo. Os animais que foram tratados com a formulação contendo 10% de extrato de nim tiveram uma média de 82,7 ninfas ingurgitadas, compatível com o percentual de recuperação médio de 41,33%.

Os níveis referentes à eficácia média, calculados a partir do número de adultos recuperados nos diferentes grupos experimentais estão descritos na figura 3. A eficácia média do grupo tratado com a formulação contendo extrato de nim na concentração de 2% foi de 18,03. Embora o número médio de ninfas ingurgitadas do grupo tratado com a concentração de 5% tenha sido menor que os demais grupos, a eficácia média ao longo do período experimental foi melhor no grupo tratado com a concentração de 10%. No presente trabalho, o número de ninfas que conseguiram realizar ecdise e chegar ao estágio adulto foi maior no grupo controle com um total de 476 adultos. O número de adultos nos demais grupos 2, 5 e 10% foram de 390; 279 e 209 adultos respectivamente.

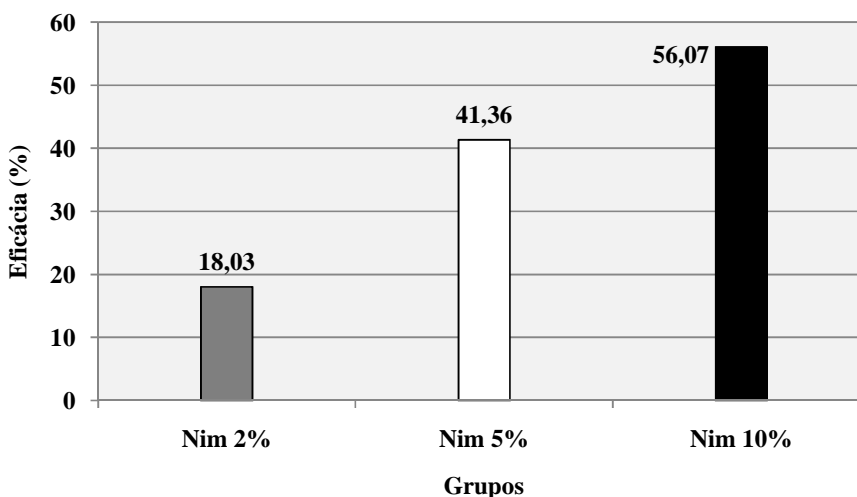


Figura 3. Eficácia carrapaticida do nim nas diferentes concentrações no controle de ninfas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* em coelhos infestados artificialmente.

Tabela 4. Número de ninfas ingurgitadas recuperadas de *Rhipicephalus sanguineus* recuperadas de coelhos infestados artificialmente nos diferentes dias e grupos experimentais.

Grupos/Animais	Número de ninfas alimentadas recuperadas			
	Dia + 3	Dia + 4	Dia + 5	Total
Controle				
01	10	54	44	108
02	09	78	70	157
03	08	34	49	91
04	05	87	95	187
05	09	94	97	200
06	08	77	76	161
Média ± DP¹	8,17±1,57	70,67±20,52	71,83±20,36	150,7^a±39,33
Nim 2%				
07	06	49	43	98
08	04	42	38	84
09	09	47	38	94
10	12	79	54	145
11	05	58	37	100
12	08	32	48	88
Média ± DP	7,33±2,69	51,17±14,69	43±6,22	101,5^{ab}±20,21
Nim 5%				
13	05	34	48	87
14	09	26	10	45
15	02	51	44	97
16	07	36	03	46
17	09	19	38	66
18	10	18	20	48
Média ± DP	7±2,77	30,67±11,34	27,17±17,15	64,8^b±20,65
Nim 10%				
19	02	15	22	39
20	08	48	40	96
21	12	69	48	129
22	09	44	34	87
23	08	67	49	124
24	0	18	3	21
Média ± DP	6,5±4,15	43,5±21,16	32,67±16,08	82,7^b±40,33

¹Desvio padrão; Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem significativamente (P>0,05).

Tabela 5. Número de ninfas ingurgitadas, percentual de recuperação e adultos não alimentados recuperados de *Rhipicephalus sanguineus* recuperados em coelhos infestados artificialmente nos diferentes grupos experimentais.

Grupos/Animais	N⁰ Ninfas Recuperadas	Percentual de Recuperação	N⁰ Adultos Recuperados
Controle			
01	108	54	76
02	157	78,5	55
03	91	45,5	87
04	187	93,5	116
05	200	100	101
06	161	80,5	41
Média ± DP¹	150,7	75,3	79,3^a ± 25,6
Nim 2%			
07	98	49	69
08	84	42	76
09	94	47	47
10	145	72,5	65
11	100	50	68
12	88	44	65
Média ± DP	101,5	50,75	65^a ± 8,9
Nim 5%			
13	87	43,5	22
14	45	22,5	20
15	97	48,5	60
16	46	23	39
17	66	33	40
18	48	24	48
Média ± DP	64,8	32,42	38,2^b ± 14,0
Nim 10%			
19	39	19,5	21
20	96	48	53
21	129	64,5	50
22	87	43,5	27
23	124	62	48
24	21	10,5	10
Média ± DP	82,7	41,33	34,8^b ± 16,3

¹Desvio padrão; Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem significativamente (P>0,05).

4.2.3 Adultos

O número carrapatos fixados observados até o momento da coleta das fêmeas ingurgitadas e de fêmeas ingurgitadas recuperadas de cada coelho por dia de experimentação, nos diferentes grupos encontram-se expressos na Tabela 6.

O número de carrapatos fixados até o momento do início da coleta das fêmeas ingurgitadas foi similar em todos os animais dos grupos, com média de 48,3; 47; 47; 46 carrapatos fixados nos grupos controle e nos grupos tratados com extrato de nim nas concentrações de 2; 5 e 10% respectivamente. Com os resultados obtidos, pode-se afirmar que o efeito de repelência relatado na literatura quanto ao emprego do nim não foi observado. Para efeito de comparação entre os grupos experimentais foi utilizado as médias como parâmetros, uma vez que um animal pertencente ao grupo tratado com a formulação contendo 10% de nim morreu durante o período experimental.

O número de fêmeas ingurgitadas recuperadas por dia de experimentação foi similar entre todos os grupos, ocorrendo uma maior taxa de recuperação nos dias + 7 e + 8. No último dia de coleta dos carrapatos, uma maior recuperação foi observada nos grupos tratados com as concentrações de 5 e 10%. O número de fêmeas ingurgitadas recuperadas foi maior no grupo tratado com a formulação com 5% de nim, com 124 fêmeas ingurgitadas recuperadas, com média de 20,6 por animal, seguido pela concentração de 2%, com 122 fêmeas ingurgitadas recuperadas, com média de 20,3 por animal; controle com 118 fêmeas ingurgitadas recuperadas, com média de 19,6 por animal e finalmente com o produto contendo concentração de 10%, com média de 18,2 por animal.

As fêmeas ingurgitadas coletadas eram lavadas em água corrente, secas com papel filtro para posteriormente serem pesadas e fixadas em placas de Petri, onde eram mantidas em estufas do tipo BOD com temperatura média de 27 °C e umidade relativa de 80%. Após 15 dias as posturas das fêmeas ingurgitadas foram pesadas e colocadas em seringas adaptadas, lacradas com algodão e novamente acondicionadas nas estufas, respeitando as mesmas faixas de temperatura e umidade. O resultado do peso médio das fêmeas ingurgitadas, peso médio das posturas e dos respectivos percentuais de eclosão das larvas encontram-se listados na tabela 7.

O peso médio das fêmeas ingurgitadas recuperadas do grupo controle foi maior que nos demais grupos, mesmo sendo recuperadas mais precocemente que nos grupos tratados com os produtos nas concentrações de 5 e 10%, com média de 3,627 gramas. O peso médio dos demais grupos tratados foi de 2,736 para o grupo tratado com a concentração de 2%; 3,026 para a concentração de 5% e de 2,786 para a concentração de 10%.

Mesmo recuperando um número menor de fêmeas ingurgitadas, o grupo controle apresentou peso total das posturas e peso médio superior aos demais grupos com 14,562 gramas, média de 2,427 gramas, respectivamente. Embora tenha apresentado uma grande diferença na capacidade de se alimentar, superando os demais grupos tratados, as fêmeas ingurgitadas do grupo tratado com a formulação de 5% obtiveram peso de postura similar aos demais grupos tratados com peso médio de 1,890, com o grupo na concentração de 2% apresentando peso médio de 1,704 e o grupo tratado com a formulação na concentração de 10% com peso médio de 1,733.

Tabela 6. Número carrapatos adultos fixados observados até o momento da coleta das teleóginas e de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* recuperadas de coelhos infestados artificialmente nos grupos experimentais.

Grupos/ Animais	Carrapatos Fixados	Número de fêmeas ingurgitadas recuperadas					Total
		Dia +6	Dia +7	Dia +8	Dia +9	Dia +10	
Controle							
01	50	3	7	7	1	4	22
02	49	4	7	6	5	3	25
03	47	2	8	7	2	2	21
04	49	5	5	2	2	1	15
05	49	2	5	3	5	0	15
06	46	6	2	8	4	0	20
Média±DP¹	48,3	3,6	5,6	5,5	3,2	1,6	19,6^a±3,6
Nim 2%							
07	48	4	8	8	4	0	24
08	50	3	7	8	4	3	25
09	47	6	6	0	5	0	17
10	49	1	8	8	1	2	20
11	43	1	6	4	2	7	20
12	45	2	6	5	2	1	16
Média±DP	47	1,2	6,8	5,5	3	2,2	20,3^a±3,3
Nim 5%							
13	49	3	6	6	1	3	19
14	47	3	3	3	3	3	15
15	45	0	9	8	2	4	23
16	49	3	5	8	1	8	25
17	46	0	5	6	3	6	20
18	46	2	8	5	0	7	22
Média±DP	47	1,8	6	6	1,7	5,2	20,6^a±3,2
Nim 10%							
19	47	3	3	6	1	5	18
20	41	Óbito	Óbito	Óbito	Óbito	Óbito	Óbito
21	44	0	8	2	6	4	20
22	49	1	5	6	3	7	22
23	45	0	7	4	2	10	23
24	50	1	3	4	0	0	8
Média±DP	46	1	5,2	4,4	2,4	5,2	18,2^a±5,4

¹Desvio padrão; Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem significativamente (P>0,05).

Tabela 7. Número de fêmeas ingurgitadas recuperadas, peso médio das fêmeas ingurgitadas, peso médio das posturas e percentual de eclosão de carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* em coelhos infestados artificialmente nos diferentes grupos experimentais.

Grupos/Animais	N^o Fêmeas ingurgitadas	Peso das Fêmeas ingurgitadas	Postura	(%) Eclosão
Controle				
01	22	5,038	3,586	98
02	25	5,125	3,525	95
03	21	2,646	2,016	97
04	15	2,43	1,635	100
05	15	2,58	1,5	99
06	20	3,94	2,3	99
Média	19,6	3,627	2,427	98^a
DP¹	3,63	1,14	0,83	1,63
Nim 2%				
07	24	2,952	1,944	98
08	25	2,625	1,525	91
09	17	2,703	1,564	86
10	20	2,44	1,36	95
11	20	4	2,84	97
12	16	1,696	0,992	90
Média	20,3	2,736	1,704	92,8^a
DP	3,29	0,68	0,58	4,21
Nim 5%				
13	19	2,66	1,881	85
14	15	2,67	1,83	56
15	23	2,668	1,748	74
16	25	3,75	2,3	65
17	20	3,26	1,82	67
18	22	3,146	1,76	94
Média	20,6	3,026	1,890	73,5^a
DP	3,19	0,40	0,18	12,73
Nim 10%				
19	18	2,574	1,656	63
20	Óbito	Óbito	Óbito	Óbito
21	20	3,04	1,96	68
22	22	3,718	2,266	54
23	23	3,542	2,093	59
24	8	1,056	0,688	47
Média	18,2	2,786	1,733	58,2^b
DP	5,38	0,95	0,55	7,24

¹Desvio padrão; Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem significativamente (P>0,05).

Os percentuais de eclosão diferiram entre os grupos do presente estudo. O grupo controle apresentou eclosão média de 98%, seguido pelo grupo tratado com 2% de extrato de nim com percentual de eclosão de 92,8%. Já no grupo tratado com a concentração de 5%, a eclodibilidade das larvas oriundas de fêmeas tratadas foi de 73,5%. As menores taxas de eclosão foram observadas no grupo onde foi aplicado o produto contendo extrato de nim na concentração de 10%. Os dados observados são compatíveis com os descritos na literatura através do efeito denominado dose-dependente, onde maiores concentrações provocam efeitos mais tóxicos.

Após o cálculo da eficiência reprodutiva de cada grupo experimental, foi calculada a eficácia carrapaticida calculada está listada na (figura 4). A concentração de 2% foi a que apresentou menor percentual de eficácia com 11,9%. Já a concentração de 5% apresentou eficácia de 29,9%, enquanto a maior concentração, 10%, apresentou níveis de eficácia de 44,8%.

Os resultados na literatura indicam que o extrato de nim aplicado de forma isolada em testes *in vitro* apresentam baixa eficácia no controle de *R. sanguineus*, em qualquer fase parasitária, sobretudo na fase adulta. Os resultados satisfatórios são descritos apenas ao empregar altas concentrações ou a associação de outros fitoterápicos. Esses resultados são descritos não apenas para *R. sanguineus* como para outra espécie de carrapatos. Em 1995, Tripathy et al. utilizaram um produto comercial composto por extratos das plantas *A. indica*, *C. deodara* e *E. ribes* em testes *in vitro* e *in vivo* no controle de cães naturalmente infestados com *R. sanguineus*. Os autores relatam resultados superiores ao presente estudo em ambos os testes uma vez que todos os carrapatos morreram após o contato com o produto, que foi empregado com intervalos de vinte e quatro horas até o produto apresentar 100% de eficácia.

Kalakumar et al. (2000) relatam resultados superiores ao presente estudo ao empregarem em testes *in vivo* extrato de duas plantas, *A. indica* e *A. squamosa* e do piretróide permetrina em três espécies de carrapatos *R. microplus*, *H. anatolicum* e *R. haemaphysaloides* parasitando naturalmente bovinos e bubalinos. Os piores resultados foram obtidos no emprego do Nim que além de não ser totalmente, o produto não foi capaz de impedir a oviposição das fêmeas.

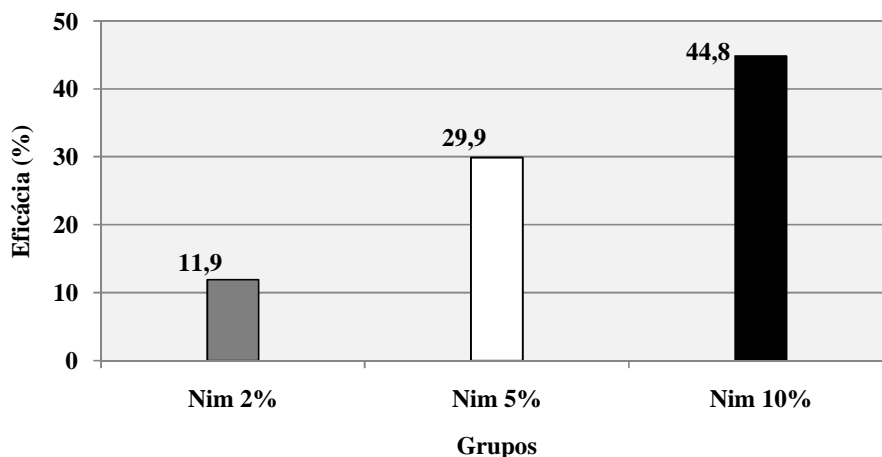


Figura 4. Eficácia carrapaticida do nim nas diferentes concentrações no controle de fêmeas ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* em coelhos infestados artificialmente.

No trabalho, os testes *in vivo* apresentaram baixa eficácia no controle de todas as fases parasitárias do carrapato *R. sanguineus*, independente da dose utilizada na experimentação. Os resultados são diferentes aos relatados na literatura, embora a grande maioria tenha empregado somente testes *in vitro*, muitas vezes, utilizando formulações com mais de um fitoterápico. O principal efeito observado ao utilizar o extrato de nim nos carrapatos, foi o fato do produto controlar, indiretamente, o ciclo evolutivo dos carrapatos, como a literatura relata, uma vez que houve uma diminuição na taxa de eclosão do grupo onde foi empregado o nim na concentração de 10%.

CAPÍTULO IV

EFICÁCIA DO NIM (*Azadirachta indica*) NO CONTROLE DE LARVAS E NINFAS *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787) (ACARI: IXODIDAE)

RESUMO

Os ixodídeos são ectoparasitos que infestam os animais domésticos e silvestres, causando impacto no sistema de exploração animal. Ocasionalmente podem parasitar o homem levando a desordens na saúde pública. Entre os ixodídeos, o carrapato *Amblyomma cajennense* é um dos que apresentam menor especificidade parasitária, podendo causar diversas doenças ao homem, incluindo *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa. O controle do parasito tem sido realizado nos últimos anos empregando compostos químicos que são, em sua maioria, tóxicos para o animal, meio ambientes e seres humanos. O presente trabalho foi realizado com objetivo de avaliar a eficácia do extrato aquoso de nim, em diferentes concentrações, através de testes *in vivo* no controle de larvas e ninfas de *A. cajennense*. Foi utilizada apenas a concentração de 10% em larvas e ninfas não alimentadas. O número de larvas ingurgitadas recuperadas do grupo controle foi menor que o numero de larvas do grupo tratado, demonstrando a incapacidade do nim em repelir os carrapatos. Entretanto, as larvas do grupo tratado sofreram alteração na ecdise. O nível de eficácia calculada a partir do número de larvas infestadas e o número de ninfas recuperadas foram de 27,91%. Não foram observadas quaisquer diferenças entre as ninfas do grupo controle e as do grupo tratado. Mesmo com alteração na ecdise das larvas, o extrato aquoso de nim, na concentração de 10% foi ineficaz no controle de larvas e ninfas de *A. cajennense*.

Palavras-chave: *Amblyomma cajennense*; Carrapatos; Controle; Nim; Biopesticida

ABSTRACT

Ixodid ticks are ectoparasites which infest both domestic and wild animals, causing impact to animal husbandry. *Amblyomma cajennense* is one of the ixodids with lower parasitic specificity, and can cause various diseases to man, including *Rickettsia rickettsii*, etiological agent of the spotted fever. Recently, the control of this parasite has been realized by using chemical compounds, which are, in general, toxic to the animals, the environment and human beings. The objective of the present study was to evaluate the efficacy of different concentrations of a 10% neem aqueous extract on the control of *A. cajennense* larvae and nymphs using an *in vivo* assay. The number of engorged larvae recovered from the control group was lower than the number from treated group, demonstrating inefficacy in repelling ticks. However, treated larvae suffered alterations on ecdysis. The efficacy level calculated from the number of infested larvae and number of recovered nymphs was 27.91%. No difference was observed between, nymphs from control and treated groups. Even leading to alterations on larval ecdysis, the 10% neem aqueous extract was inefficacious on the control of *A. cajennense* larvae and nymphs.

Keywords: *Amblyomma cajennense*; Ticks; Control; Neem; Biopesticide

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, há relatos de trinta e duas espécies de carrapatos pertencentes ao gênero *Amblyomma*, sendo a espécie *A. cajennense* a de maior prevalência. É popularmente conhecido por vários nomes, dependendo da fase evolutiva, como carrapato estrela, vermelhinho e micuim nas fases adultas, ninfas e larvas, respectivamente.

É um carrapato heteroxeno, ou seja, necessitam de três hospedeiros para completar a fase parasitária, sendo, um para a larva, um para a ninfa e outro para o estágio adulto. De modo geral, os estágios de larva e ninfa são os que apresentam menor especificidade parasitária, podendo parasitar diferentes espécies. São responsáveis por causar intenso prurido e dor no momento da alimentação (LEMOS et al., 1997).

É a espécie incriminada por servir de vetor e reservatório da febre maculosa, uma rickettsiose com agente etiológico *Rickettsia rickettsii*, devido à transmissão transovariana que ocorre nos carrapatos. Assim sendo, as larvas do carrapato já são capazes de transmitir a doença a outros hospedeiros. Todas as fases parasitárias do ciclo evolutivo são hematófagas e têm como hospedeiros mamíferos silvestres, reservatório natural da doença, além de capivaras, gambás, coelhos, cotias; aves silvestres e animais domésticos como cavalos, bois, carneiros, porcos e cães. Existe a hipótese de transmissão peridomiciliar onde o cão seria o principal carreador de carrapatos para o ambiente doméstico.

Algumas pesquisas relatam ainda a participação de *A. cajennense* na transmissão de *Cowdria ruminantium* e *Ehrlichia bovis* (OLIVEIRA, 2004). A picada deste carrapato causa intenso prurido ao hospedeiro (LEMOS et al., 1997).

Os animais de companhia vêm a cada dia conquistando um maior espaço nos lares e nas vidas da população mundial. O estreitamento desse convívio, no entanto, faz com que seja necessária uma especial atenção à saúde animal, pois são inúmeras as doenças compartilhadas entre estes e os humanos. Nesse contexto, os carrapatos fixados nos animais domésticos podem eventualmente parasitar os seres humanos e ocasionar a transmissão de patógenos.

O controle desta espécie é feito utilizando principalmente grupamentos químicos, que ao serem utilizados de maneira errônea, favorece o aparecimento de resistência das populações, além de promover a contaminação dos animais e do ambiente, podendo levar a intoxicação dos animais. O desenvolvimento de produtos biopesticidas visa à valorização de uma vida de hábitos mais saudáveis, com efeitos colaterais menores que os observados nos medicamentos sintéticos; a descoberta de novos princípios ativos nas plantas; a comprovação científica de fitoterápicos; e o preço que, de maneira geral, é mais acessível à população com menor poder aquisitivo.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia de uma formulação contendo 10% de nim no controle de larvas e ninfas do carrapato *A. cajennense* através de testes *in vivo*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O carrapato *A. cajennense* é um carrapato encontrado principalmente em animais de produção, sendo o seu controle realizado através do emprego de substâncias químicas, técnicas de rotação de pastagens e o controle estratégico, realizado de acordo com a biologia do parasito. Entretanto, com a exploração de novas áreas para a agricultura e o desenvolvimento de novas opções de lazer como o ecoturismo, proporcionam não só os humanos, mas os cães, contato com carrapatos contaminados.

O controle do parasito é realizado com rotação de pastagens, porém os diferentes estágios do carrapato podem sobreviver por longos períodos de jejum. As queimadas eram utilizadas com frequência. Entretanto, devido aos prejuízos ao meio ambiente, é uma modalidade de controle que vem deixando de ser empregada, além da possibilidade de alguns exemplares do carrapato sobreviverem, pois os mesmos podem penetrar em rachaduras presentes no solo (LEITE et al., 1997).

Nos dias de hoje este controle é efetuado, na maior parte dos casos, com o recurso a pesticidas, compostos por substâncias químicas que apresentam elevada toxicidade para o ambiente e para os seres humanos, sobretudo quando o parasito a ser controlado é *A. cajennense*, pois necessita de concentrações mais elevadas de formulações carrapaticidas do que as utilizadas para *R. (B) microplus*.

Lindsay e Kaufman (1988) observaram um aumento no período de pré-postura ao utilizarem extratos de nim em fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma americanum*.

Webb e David (2002) empregaram extratos de nim na concentração de 5% no controle de carrapatos em bovinos naturalmente infestados e mantidos em um campo contaminado com as espécies de carrapato: *A. hebraeum*; *R. evertsi*; *H. truncatum* e *B. decoloratus*. Os resultados obtidos pelos autores são promissores uma vez que a média de carrapatos presentes nos animais do grupo tratado foi de 19,75%.

Os extratos de nim também foram eficazes no controle do carrapato *H. anaticum excavatum* onde através de testes *in vitro* o tempo de eclosão das larvas foi mais rápida no grupo tratado com óleo de nim, levando a larvas a alterações em sua morfologia e posterior morte. Ao utilizarem um produto comercial com 5% de azadiractina obtiveram 100% de mortalidade das larvas e na concentração de 12,8%, a mesma eficácia em ninfas e adultos não ingurgitados. Na mesma concentração não foi observado eclodibilidade das larvas (ABDEL-SHAFFY; ZAYED, 2002).

Uma das formas de se detectar a carga parasitária e a ixodofauna de determinada localidade é arrastar um pano, preferencialmente branco, sobre a vegetação. Essa técnica foi empregada na Suécia por Garboui et al. (2006) que associaram ainda óleo de nim, surfactantes e citronela no pano em uma área contaminada por *Ixodes ricinus*. Os resultados demonstraram que os produtos em conjunto apresentaram efeito de repelência para as ninfas do carrapato.

Makeri et al. (2007) empregaram diferentes concentrações de óleo de Nim no controle de *A. variegatum* em testes *in vitro* e *in vivo*. Segundo os autores, todas as concentrações testadas, 1,0 2,5 e 5,0% foram eficazes no controle do carrapato nos testes *in vitro*. Entretanto, nos testes *in vivo*, nenhum efeito acaricida foi observado, apenas as concentrações de 2,5 e 5,0% apresentaram efeito repelente.

O óleo de nim também foi aplicado com sucesso por Kaaya et al. (2007) no controle de *A. variegatum* em caprinos e em coelhos, como também para o controle de *A. variegatum*, *R. appendiculatus* e *B. decoloratus* em bovinos. Os resultados demonstraram que a eficácia está diretamente ligada a concentração do óleo, controlando todas as fases imaturas do carrapato. Os períodos de fixação no hospedeiro e de muda foram significativamente maiores

nos animais tratados. A formulação spray contendo óleo de nim a 25% reduziu por até cinco dias o número de carrapatos das espécies *A. variegatum*, *R. apendiculatus* e *B. decoloratus* em bovinos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Avaliação da eficácia do nim em testes *in vivo* para *Amblyomma cajennense*

Todas as etapas do ensaio *in vivo* foram realizadas nas dependências do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV). Foram utilizados 12 coelhos com média de três meses idade, alimentados exclusivamente com ração e água *ad libitum*, para cada ensaio. Os coelhos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos com seis animais cada. No dia zero, os animais do grupo 1 foram mantidos sem tratamento, grupo controle. Os animais pertencentes ao grupo 2 foram tratados com nim na concentração de 10%.

Foi utilizada a emulsão de nim, a partir do óleo de nim puro, adquirido do laboratório Natural Rural®. Para o preparo da emulsão foi acrescentado a uma parte do óleo, tween 80 (emulsificante) na concentração de 30%. Posteriormente, a solução foi levada a um agitador magnético com aquecimento, onde permanecia por 10 minutos a uma temperatura de 40° C, completando até a quantidade desejada com água. A dose empregada em cada coelho foi de 3 ml/kg de peso vivo, aplicada com auxílio de um borrifador.

No dia +1, seguindo a metodologia de Neitz et al. (1971) utilizada para manutenção de colônia, foi colocado um saco de pano aderido à base das orelhas do coelho. No dia +2, foram realizadas as infestações com os carrapatos não alimentados de cada estágio, oriundos de uma colônia localizada nas dependências do mesmo laboratório, sendo o local de escolha para as infestações a região entre as orelhas. Todas as infestações referentes a cada estágio do parasito foi realizada em etapas distintas. No ensaio utilizando larvas, cada coelho foi infestado com 200 larvas não alimentadas. No ensaio utilizando ninfas, cada coelho foi infestado com 50 carrapatos não alimentados da espécie *A. cajennense*.

Foram realizadas observações diárias nos animais para avaliar a fixação dos carrapatos, reações adversas do produto, mortalidade dos carrapatos e coleta dos carrapatos ingurgitados. Após a queda de todos os carrapatos, os mesmos foram separados em seringas de maneira que os carrapatos de cada animal não tivessem contato com os animais do mesmo grupo. As seringas após a devida identificação eram então acondicionadas em câmaras climatizadas com demanda bioquímica de oxigênio a uma temperatura média de 27 °C e umidade relativa de 80%.

Ao final de trinta dias de observação, a avaliação da eficácia foi calculada com a seguinte fórmula: [(Total das ninfas / adultos recuperados do grupo controle – Total das ninfas / adultos recuperados do grupo tratado) ÷ Total das ninfas / adultos recuperados do grupo controle] X 100.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Larvas

O número de larvas ingurgitadas recuperadas por dia experimental de cada coelho por dia de experimentação, nos diferentes grupos encontra-se listados na Tabela 1. O número médio de larvas ingurgitadas coletadas foi similar nos dois grupos experimentais, recuperando 564 larvas no grupo controle e 637 no grupo tratado com a formulação contendo 10% de nim. Os carrapatos foram recuperados entre os dias + 4 e + 7, com maiores taxas de recuperação nos dias + 5 e + 6 em ambos os grupos. A partir dos resultados observados é possível afirmar que o produto não foi eficaz no controle direto das larvas, pois não impediu a fixação dos carrapatos no grupo tratado, tão pouco retardou sua fixação, uma vez que a data da coleta dos parasitos foi similar.

O percentual médio de recuperação foi similar nos grupos experimentais. O grupo controle apresentou percentual médio de recuperação no valor de 47, representando uma média de 94 larvas ingurgitadas por coelho. O grupo tratado apresentou melhores níveis de recuperação com percentual médio de 53,1 com número médio de larvas ingurgitadas de 106,2 por animal infestado (Tabela 2).

Tabela 1. Número de larvas ingurgitadas recuperadas de *Amblyomma cajennense* por dia experimental em coelhos infestados artificialmente nos diferentes grupos experimentais.

Número Coelho	Número de Larvas Recuperadas				Total
	Dia + 4	Dia + 5	Dia + 6	Dia + 7	
Controle					
01	21	61	22	2	106
02	45	58	12	1	116
03	34	50	12	1	97
04	7	51	15	6	79
05	2	50	14	3	69
06	53	37	6	1	97
Total	162	307	81	14	564^a
Média	27	51,17	13,5	2,33	94
DP	20,5	8,32	5,2	1,97	17,3
Nim 10%					
07	10	37	12	7	66
08	24	62	25	3	114
09	45	58	15	3	121
10	18	55	9	2	84
11	81	53	17	1	152
12	17	75	5	3	100
Total	195	340	83	19	637^a
Média	32,5	56,67	13,83	3,17	106,2
DP	26,6	12,4	6,94	2,04	30,1

¹Desvio padrão; Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem significativamente (P>0,05).

Tabela 2. Número de larvas ingurgitadas recuperadas de *Amblyomma cajennense* em coelhos infestados artificialmente, percentual de eclosão e número de ninfas recuperadas nos diferentes grupos experimentais.

Grupos/Animais	Nº Larvas Recuperadas	Percentual de recuperação	Nº Ninfas Recuperadas
Controle			
01	106	53	65
02	116	58	84
03	97	48,5	77
04	79	39,5	49
05	69	34,5	42
06	97	48,5	77
Total	564	-	394
Média	94	47	65,7
DP	15,8		15,4
Nim 10%			
07	66	33	31
08	114	57	65
09	121	60,5	48
10	84	42	35
11	152	76	77
12	100	50	28
Total	637	-	284
Média	106,2	53,1	47,3
DP	27,5		18,2

¹Desvio padrão; Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem significativamente (P>0,05).

Embora tenha sido recuperados um maior número de larvas ingurgitadas no grupo tratado em relação ao grupo controle, o percentual de ecdise foi maior no grupo controle, recuperando um total de 394 ninfas ao final do período experimental e no grupo tratado, das 637 larvas ingurgitadas recuperadas, apenas 284 ninfas foram observadas ao final do período experimental. O nível de eficácia calculada a partir do número final de ninfas recuperadas foi de 27,91%. Os valores descritos no trabalho demonstram que o produto alterou a ecdise das larvas para as ninfas.

4.2 Ninfas

O número de ninfas ingurgitadas recuperadas por dia experimental de cada coelho por dia de experimentação, nos diferentes grupos encontra-se listados na Tabela 3.

Tabela 3. Número de ninfas ingurgitadas recuperadas de *Amblyomma cajennense* em coelhos infestados artificialmente, por dia, nos diferentes grupos experimentais.

Grupos/ Animais	Número de Ninfas Recuperadas				
	Dia + 4	Dia + 5	Dia + 6	Dia + 7	Total
Grupo 1					
01	0	9	0	0	9
02	0	4	3	0	7
03	0	2	3	1	6
04	0	6	0	0	6
05	0	-	-	-	-
06	0	8	2	0	10
Total	0	29	8	1	38
Média	0	5,8	1,6	0,2	7,6^a
DP	0	2,6	1,3	0,4	1,6
Grupo 2					
07	0	3	0	0	3
08	0	0	0	0	0
09	0	8	1	0	9
10	0	1	1	0	2
11	0	1	2	1	4
12	0	11	4	2	17
Total	0	24	8	3	35
Média	0	4	1,3	0,5	5,8^a
DP	0	4,1	1,4	0,8	5,7

¹Desvio padrão; Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem significativamente (P>0,05).

O número total de ninfas ingurgitadas do grupo controle foi similar ao do grupo tratado. Entretanto, as médias apresentaram pequena diferença, uma vez que o grupo controle apresentou uma média de 7,6 ninfas recuperadas e o grupo tratado, média de 5,8 carrapatos. O percentual de recuperação de ninfas ingurgitadas e o número de adultos observados ao final do período experimental encontram-se listados na Tabela 4.

Independente do grupo experimental, todas as ninfas ingurgitadas realizaram ecdise para adultos. Os resultados no presente estudo relatam a ineficácia do produto contendo 10% de extrato de nim no controle de ninfas de *A. cajennense*, uma vez que o percentual de recuperação foi similar nos grupos tratado e controle e o efeito do nim de alterar o processo de muda dos parasitos não foi observado, pois todos os carrapatos coletados realizaram ecdise.

Até o presente momento, não foi identificado na literatura consultada, trabalhos envolvendo o controle de *A. cajennense* com produtos fitoterápicos através da realização de testes *in vivo*, como no presente estudo. Os trabalhos relatados foram feitos através de testes *in vitro* utilizando diferentes plantas e estágios dos parasitos, impossibilitando comparações fidedignas com o presente estudo.

O uso do nim já foi descrito em testes *in vitro* para outras espécies de carrapatos. Em 2002, Abdel-Shafy e Zayed testaram um produto comercial contendo 5% de azadiractina em diferentes concentrações em ovos, larvas, ninfas e adultos da espécie *H. anaticum*. Dependendo da concentração, foi observada a morte de 100% das larvas, ninfas e adultos com inibição da eclosão das larvas oriundos dos ovos tratados, resultados superiores aos estudo,

Tabela 4. Número de ninfas ingurgitadas recuperadas de *Amblyomma cajennense* em coelhos infestados artificialmente, percentual de eclosão e número de adultos recuperados nos diferentes grupos experimentais.

Grupos/Animais	Nº Ninfas Recuperadas	Percentual de Recuperação	Nº Adultos Recuperados
Grupo 1			
01	9	18	9
02	7	14	7
03	6	12	6
04	6	12	6
05	-	-	-
06	10	20	10
Total	38	-	38
Média	7,6	15,2	7,6^a
DP	1,62		1,62
Grupo 2			
07	3	6	3
08	-	-	-
09	9	18	9
10	2	4	2
11	4	8	4
12	17	34	17
Total	35	-	35
Média	5,8	14	7^a
DP	5,54		5,54

¹Desvio padrão; Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem significativamente (P>0,05).

utilizando metodologias distintas. Em ambos os trabalhos foi observado que o extrato de nim não provocou nenhuma alteração na ecdise das ninfas tratadas, independente da espécie de carrapato. Em 2006, Clemente et al. empregaram o óleo da planta *C. citratus* no controle de larvas de *A. nitens* e *A. cajennense* com resultados semelhantes ao presente estudo, uma vez que o óleo da planta não apresentou eficácia para as larvas das espécies testadas.

Garboui et al. (2006) ao empregarem uma flanela impregnada com óleo de Nim em um campo contaminado com o carrapato *I. ricinus*, relatam a eficácia do produto ao repelir ninfas do carrapato. No presente estudo, não foi observado esse fenômeno, uma vez que todos os carrapatos fixaram no hospedeiro após vinte e quatro horas em ambos os grupos.

Teixeira et al. (2007) utilizaram extrato alcoólico de andiroba, *C. guianensis* e citronela *C. nardus*, ambas na concentração de 10%, em larvas não ingurgitadas do carrapato *A. cajennense*. Ao utilizarem os extratos de andiroba os resultados são superiores ao presente trabalho com mortalidade relatada pelos autores de 100%, enquanto que para o uso de citronela a eficácia média relatada foi de apenas 13,38% inferior ao presente estudo com eficácia de 27,91% no controle de larva, embora Teixeira tenha usado apenas testes *in vitro*.

O extrato de nim já foi empregado em outras espécies de carrapatos em testes *in vivo*. Kaaya et al. (2007) administraram óleo de nim através da alimentação em ovinos naturalmente infestados com carrapatos da espécie *A. variegatum* com o intuito de avaliar sua eficácia. Os resultados foram superiores ao presente estudo, uma vez que os carrapatos não

conseguiram se fixar no hospedeiro. Os autores também relatam o fenômeno em coelhos, uma vez que os carrapatos não fixaram nos hospedeiro por um período de 10 dias. No presente trabalho, não foi observado esse efeito, pois as larvas e ninfas ingurgitadas de cada grupo seguiram o mesmo ritmo de coleta. Os autores ainda relatam que o emprego do nim alterou de forma significativa o período de muda. Esse fenômeno foi observado no presente estudo apenas na fase de larva.

CAPÍTULO V

EFICÁCIA DO NIM (*Azadirachta indica*) NO CONTROLE DE *Psoroptes ovis* (HERING, 1838) EM COELHOS

RESUMO

O presente trabalho foi realizado com objetivo de avaliar a eficácia de uma formulação comercial contendo 10% de extrato de nim, *Azadirachta indica* no controle de *Psoroptes ovis* em coelhos naturalmente infestados. Foram utilizados 12 coelhos separados aleatoriamente em dois grupos de seis animais cada. O grupo controle permaneceu sem tratamento, enquanto que o grupo tratado recebeu a formulação em teste, contendo 10% de nim, borrifando ambos os condutos auditivos, uma vez ao dia, por sete dias consecutivos. Os animais foram avaliados diariamente para observação de possíveis efeitos adversos do produto. Nos dias +3, +7, +14, +21, +28 e +35 foi coletado material de todos os animais para avaliação da presença de ácaros vivos. Os coelhos do grupo controle apresentavam ácaros em ambos os condutos auditivos em todos os dias de observação. O grupo tratado apresentou eficácia de 41,7% no dia +3 e 100% a partir do dia +7 até o dia +35. O produto demonstrou ser eficaz no tratamento da sarna psoróptica em coelhos. Entretanto, todos os animais apresentaram reações dermatológicas, tais como alopecia e hiperemia no local de aplicação do produto, variando de baixa a média severidade.

Palavras-chave: *Psoroptes ovis*; Controle; Nim; Biopesticida

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the efficacy of commercial formulation containing 10% of neem (*Azadirachta indica*) extract, on the control of *Psoroptes ovis* in naturally infested rabbits. Twelve rabbits were randomly divided in two groups of six animals. The control group remained without treatment, while the other group received as treatment the 10% Neem extract formulation, by spraying both ears daily for seven consecutive days. The animals were evaluated daily for the presence of adverse effects. Material from all animals, ears were collected on days +3, +7, +14, +21, +28 and +35 in order to be evaluates for the presence of living mites. Animals from control group presented mites in both ears along all days of observation. The treated group presented an efficacy of 41.7% on day +3 and 100% from day +7 to +35. The product containing 10% Neem extract has demonstrated to be effective for the treatment of psoroptic mange on rabbits. However, treated animals presented dermatological reaction such as alopecia and hyperemia at the site of application, varying from low to medium severity.

Keywords: *Psoroptes ovis*; control; Neem; Biopesticide

1 INTRODUÇÃO

O coelho doméstico (*Oryctolagus cuniculus*) é considerado um animal economicamente importante por ser utilizado pela indústria na produção de carne, pele e couro, e também por serem considerados animais de companhia.

Distúrbios dermatológicos são relativamente comuns nesta espécie, interferindo na qualidade de vida dos mesmos (WHITE et al., 2002). Dentre as diversas etiologias que levam as lesões dermatológicas, os parasitos são os que prevalecem sobre bactérias, vírus e fungos.

Psoroptes ovis (HERING, 1838) são ectoparasitos obrigatórios de eqüídeos, bovinos, caprinos, ovinos e coelhos, assim como de diversas espécies de mamíferos selvagens (WALL: KOLBE, 2006), alimentando-se principalmente de exsudatos, serosidades, secreções da pele e sangue (BATES, 1999).

Nos coelhos, *P. ovis* é o ectoparasito mais relatado, encontrado principalmente nos condutos auditivos, levando a quadros de otite clínica onde são observadas crostas, ulcerações e hiperemia com formação de tecido de granulação (CHEN et al., 2000).

A infestação por tal parasito é denominada sarna psoróptica. São altamente prevalentes em coelhos domésticos localizando-se preferencialmente nos condutos auditivos, levando a quadros de otite onde são visualizados ulcerações, congestão, hiperemia com formação de tecido de granulação (CHEN et al., 2000), gerando dermatites debilitantes, alopecia, formações de crostas e intenso prurido (WHITE et al., 2002; SIEGFRIED et al., 2004). Em casos extremos, podem ser encontrada em todo corpo, considerada a forma generalizada (CUTLER, 1998; BATES, 1999), chegando a causar alterações neurológicas (WHITE et al., 2002).

O diagnóstico é confirmado examinando-se as crostas oriundas das lesões ao microscópio estereoscópico ou microscópio, onde podem ser visualizados diversos estágios do ácaro. Nos casos de altas infestações, é possível a identificação dos parasitos através de otoscopia (WHITE et al., 2002).

Minimizar o uso de produtos químicos no controle de parasitas em animais, de modo a diminuir o impacto de resíduos no meio ambiente e nos produtos de origem animal, como leite, carne e derivados, é o objetivo dos biopesticidas. Um país como o Brasil, com tantas peculiaridades e pluralidade climáticas e geográficas, abriga uma diversidade enorme de plantas que podem ser utilizadas no controle de artrópodes (JUNIOR, 2003).

O objetivo do estudo foi avaliar a eficácia do nim na concentração de 10% no controle da sarna psoróptica em coelhos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Diversos protocolos terapêuticos têm sido propostos para o tratamento desta parasitose em coelhos, podendo ser utilizado tratamento tópico ou sistêmico, não sendo necessária a remoção mecânica das crostas (WHITE et al., 2002). Dentre as principais drogas utilizadas no controle do ácaro em coelhos, destacam-se a ivermectina, moxidectina (MORRISEY, 1996; WHITE et al., 2002), eprinomectina (PAN et al., 2006) e permetrina (MELO et al., 2008). Tais drogas são muitas vezes empregadas em coelhos, mesmo não contendo indicação na bula, o que acarreta riscos no que se refere a ausência de informações sobre o período residual na carne, não informando sobre o período de carência a ser observado.

Acaricidas têm sido amplamente empregados ao longo dos anos de maneira eficaz e econômica. Entretanto, seu uso indiscriminado tem levado ao aparecimento de populações resistentes, de contaminação ambiental e quadros de intoxicação nos homens e nos animais fazendo com que novas modalidades de controle sejam desenvolvidas (WALL, 2007).

Wagner e Wendlberger (2000) relatam eficácia de 100% ao empregarem moxidectina na concentração de 0,2 mg/kg, para o tratamento de coelhos naturalmente infestados com *Psoroptes* sp. Curtis et al. (1990) relataram eficácia de 100% para *Psoroptes* sp., quando utilizaram ivermectina na concentração de 400µg/kg por via subcutânea, com a necessidade de duas aplicações.

Mc Tier et al. (2003) obtiveram 100% de eficácia com o emprego em dose única de uma formulação tópica contendo selamectina para o tratamento da sarna psorótica em coelhos. Pan et al. (2006) obtiveram, eficácia de 100% no controle de *Psoroptes* sp., em coelhos naturalmente infestados, utilizando eprinomectina.

Melo et al. (2008) relatam 100% de eficácia após empregarem a formulação spray contendo 2% do piretróide permetrina no controle de *P. ovis*, em coelhos naturalmente infestados, não sendo observadas reações adversas em nenhum animal que recebeu o tratamento.

Os extratos de Nim também já foram descritos no controle da sarna psorótica em coelhos. Dakshinkar et al. (1992) utilizaram um produto contendo óleo de nim diariamente em seis coelhos naturalmente infestados por *Psoroptes ovis*. A partir do dia +4 já era notada melhora clínica dos animais e no dia +8 nenhum ácaro, ou suas formas evolutivas foram observadas.

Maske e Kolte (1999) compararam o uso da ivermectina com uma formulação contendo os extratos de *A. indica*, *Cedrus deodara* (Cedro do Himalaia) e *Embelia ribes* (Vidanga ou falsa pimenta-negra) para o controle de *P. ovis* em coelhos naturalmente infestados encontrando resultados um pouco superiores no produto fitoterápico. Ao testarem em coelhos naturalmente infestados com *P. ovis* uma formulação na apresentação de pomada, contendo 5% de nim, Joshi et al. (2000) relatam que tal formulação não foi eficaz no controle dos ácaros, pois foram observados ácaros vivos nos dias +5, +10, +15 e + 20 após o tratamento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 12 coelhos, machos, adultos, pertencentes ao Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV), do Departamento de Parasitologia Animal, do Instituto de Veterinária, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Município de Seropédica, Rio de Janeiro. Os animais foram adquiridos no setor de cunicultura do Instituto de Zootecnia da mesma Universidade para serem utilizados na manutenção de colônia de carrapatos da espécie *Rhipicephalus sanguineus* do LQEPV.

Cada orelha foi considerada uma unidade experimental, pois são anatomicamente independentes e até onde se conhece o nim aplicado topicamente não apresenta atividade sistêmica. Todos os coelhos estavam naturalmente infestados por *P. ovis*, diagnosticados a partir da visualização dos ácaros com auxílio de microscópio estereoscópico, a partir de raspados cutâneos efetuados nas orelhas. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos com seis animais cada. Um grupo permaneceu sem tratamento, grupo controle, e o outro foi medicado.

Nenhum produto parasiticida foi empregado nos animais ou no ambiente por até 60 dias antes do tratamento. Os animais de cada grupo foram mantidos em gaiolas suspensas dentro de ambientes separados localizadas no próprio laboratório com água e comida *ad libitum* durante todo o período de experimentação.

Foi utilizada a emulsão de nim, a partir do óleo de nim puro, adquirido do laboratório Natural Rural®. Para o preparo da emulsão foi acrescentado a uma parte do óleo, tween 80 (emulsificante) na concentração de 30%. Posteriormente, a solução foi levada a um agitador magnético com aquecimento, onde permanecia por 10 minutos a uma temperatura de 40° C, completando até a quantidade desejada com água.

Nos animais pertencentes ao grupo medicado foi aspergido em cada conduto auditivo 10% de nim. Foram realizadas aplicações diárias, durante os sete primeiros dias. Foram realizadas avaliações clínicas diárias nos animais para registro de eventuais reações adversas causadas pelo produto e, também para avaliar a regressão das lesões auriculares provocadas pela ação dos ácaros. Todos os animais foram reexaminados, através da introdução de zangatoas em cada orelha, nos dias + 3, +7, +14, +21, +28 e + 35 após o primeiro dia do tratamento. O material foi avaliado com auxílio de microscópio estereoscópico. Não foi realizada limpeza ou retirada das crostas, antes ou durante o período do tratamento. A eficácia do tratamento do produto foi calculada em cada orelha através da seguinte fórmula: (número de orelhas infestadas com os ácaros vivos do grupo controle - número de orelhas infestadas com os ácaros vivos do grupo tratado) / (número de orelhas infestadas com os ácaros vivos do grupo controle) X 100. A análise estatística dos resultados foi realizada através do Teste do Qui-quadrado (χ^2) corrigido (Correção de Yates) (SAMPAIO, 1998).

4 RESULTADOS E DISCUSSAO

Todos os coelhos envolvidos no presente estudo apresentavam ácaros da espécie *P. ovis*, em ambos os condutos auditivos, identificados com auxílio de microscópio estereoscópico, além de apresentarem otite clínica (Figura 1).

Os coelhos pertencentes ao grupo controle apresentaram-se infestados por *P. ovis*, em ambos os condutos auditivos, durante todo período experimental, tendo alguns animais uma piora do quadro clínico inicial, caracterizado por hiperemia, intenso prurido, eritema e formação de crostas (Figura 2), no final do período experimental de 90 dias. Já nos animais pertencentes ao grupo tratado os seis animais continuavam positivos, embora em sua maioria, apenas uma orelha estava parasitada, conforme descrito na Tabela 1.

No grupo tratado, até o dia +3, apenas o animal número 05 tinha as duas orelhas parasitadas pelos ácaros. Já a partir do dia +7, não foram mais encontrados parasitos vivos nos animais medicados. Através do teste de χ^2 corrigido (Yates) obteve-se o valor 20,17, com ($p < 0,05$).

Como cada orelha foi considerada uma unidade experimental, observou-se no dia +3, um total de sete orelhas positivas, correspondendo a uma eficácia de 41,66%. Já nos dias subsequentes de observação, não foram encontrados parasitos vivos, em nenhuma das orelhas dos animais medicados indicando uma eficácia de 100% (Tabela 2).

Clinicamente notou-se regressão das lesões auriculares causadas pelos ácaros a partir do dia +7. Entretanto, embora seja relatada por muitos pesquisadores como uma planta muito segura para mamíferos, todos os animais apresentaram reações adversas a formulação, caracterizadas por prurido moderado, alopecia e hiperemia do local de aplicação, nitidamente visualizado a partir de setenta e duas horas após a aplicação do produto (Figura 3), conforme descrito por Ahmed e Grainge (1986) e Biswas et al. (2002) que relatam reações adversas do nim em coelhos e porquinhos-da-índia. O produto continuou a ser utilizado por mais quatro dias, completando os sete dias propostos na metodologia, causando piora no quadro clínico do animal, caracterizado por intensa hiperemia e grandes áreas alopécicas (Figura 4).



Figura 1. Otite clínica no conduto auditivo esquerdo do coelho doméstico naturalmente infestado por *Psoroptes ovis*. Notar a hiperemia e a intensa formação de crostas, secundárias ao parasitismo.



Figura 2. Otite clínica no conduto auditivo esquerdo do coelho doméstico naturalmente infestado por *Psoroptes ovis* pertencente ao grupo controle, sem tratamento, 90 dias após o início da experimentação. Notar a grave hiperemia e a acentuada formação de crostas, secundárias ao parasitismo.

Tabela 1. Presença de *Psoroptes ovis* vivos nas orelhas direita e esquerda dos coelhos pertencentes ao grupo controle e ao tratado com a formulação em teste contendo 10% de extrato aquoso de nim, *Azadirachta indica*, antes e após o tratamento.

Grupos/ Animais	Dias de Experimentação													
	Dia 0		Dia +3		Dia + 7		Dia +14		Dia + 21		Dia + 28		Dia + 35	
	OD ¹	OE ²	OD	OE	OD	OE	OD	OE	OD	OE	OD	OE	OD	OE
Nim 10%														
01	+ ³	+	+	- ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
02	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
03	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
04	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
05	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
06	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle														
07														
08	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
09	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

1- Orelha direita; 2 – Orelha esquerda; 3 – Orelha contendo ácaros vivos; 4 – Orelhas sem a presença de ácaros

Tabela 2. Eficácia do produto contendo 10% de extrato de Nim no controle da sarna psoróptica em coelhos naturalmente infestados.

Grupos	Eficácia (%)					
	Dia + 3	Dia + 7	Dia + 14	Dia + 21	Dia + 28	Dia + 35
Tratado	41,66	100	100	100	100	100



Figura 3. Animal pertencente ao grupo tratado, setenta e duas horas após o tratamento, apresentando reações adversas a aplicação do produto. Notar a hiperemia e alopecia iniciais.

Após a suspensão da utilização do produto, os animais foram acompanhados um período de noventa dias para avaliação clínica final, através do acompanhamento da otite clínica e do diagnóstico parasitológico dos animais. Houve completa remissão dos efeitos colaterais ao final do período experimental, onde as lesões já se apresentavam cobertas por pêlos (Figura 5).

As lesões eram caracterizadas por leve a moderado prurido, alopecia e hiperemia nos locais onde foi aplicado o produto. As lesões, entretanto, regrediram após o término do tratamento. Já a pele dos animais voltou à normalidade 90 dias após a suspensão do medicamento.

Atualmente, diversos protocolos terapêuticos têm sido empregados no controle da sarna psoróptica em coelhos, destacando-se o tratamento sistêmico com ivermectina (FERRERO et al., 1994; SOERENSEN, et al., 1995) ou moxidectina (WAGNER; WENDLBERGER, 2000), ou tratamentos tópicos, utilizando piretróides ou organofosforados, que embora apresentem altos níveis de eficácia, mas podem acarretar efeitos tóxicos nos animais, além da questão do resíduo na carne (O'BRIEN, 1999; HANSEN et al., 2005; MELO et al., 2008).



Figura 4. Animal pertencente ao grupo tratado, dez dias após o tratamento, apresentando reações adversas a aplicação do produto. Notar a intensa hiperemia e alopecia no local onde foi aplicado o produto.



Figura 5. Animal pertencente ao grupo tratado, no final do período experimental, noventa dias após o tratamento, apresentando recuperação total das lesões causadas pelo nim na concentração de 10% e livre do parasitismo e da otite clínica.

Outros autores relatam o emprego do óleo de Nim em coelhos naturalmente infestados com *P. ovis* com resultados distintos. Os resultados do presente estudo são similares aos descritos por Dakshinkar et al. (1992), quando utilizaram *A. indica* e *Annona squamosa* (fruta-do-conde), obtendo 100% de eficácia após o dia +8, onde não foi mais observado nenhum estágio evolutivo do parasito. Maske e Kolte (1999) compararam o uso da ivermectina com uma formulação contendo os extratos de *A. indica*, *Cedrus deodara* (Cedro do Himalaia) e *Embelia ribes* (Vidanga ou falsa pimenta-negra) para o controle de *P. ovis* em coelhos naturalmente infestados. Foi observada melhor eficácia da associação dos fitoterápicos em relação ao emprego da ivermectina. Os resultados são similares ao presente estudo, embora tenha sido utilizado apenas o nim, possivelmente, conforme os dados do presente trabalho, o principal fármaco com ação sobre *P. ovis* da formulação testada por Maske e Kolte (1999) seja *A. indica*.

Ao empregarem em coelhos infestados naturalmente por *P. ovis*, uma pomada contendo óleo de Nim a 5%, Joshi et al. (2000) relatam que tal formulação não foi eficaz no controle dos ácaros. Tais resultados podem ser pela menor concentração empregada ou por sua apresentação, não permitindo que o produto tivesse boa dispersão, sendo estes resultados inferiores aos do presente estudo.

A literatura descreve a utilização de outras plantas no controle da sarna psoróptica em coelhos. Os resultados relatados por Macchioni et al. (2004) são similares ao presente estudo, pois em ambos os ensaios foram obtidos altos níveis de eficácia, setenta e duas horas após a utilização das formulações em teste. Os autores utilizaram extrato aquoso da planta *Matricaria chamomilla* na concentração de 10%. Em 2007, Fichi et al. relatam resultados similares ao presente estudo ao utilizarem extratos da planta *Eugenia caryophyllata* em coelhos parasitados com *P. cuniculi*.

Os resultados do presente estudo demonstraram que o nim na concentração de 10% é eficaz no controle da sarna psoróptica em coelho. Entretanto, em todos os animais houve graves reações a aplicação do produto, contrariando a maioria dos relatos disponíveis na literatura que mencionam a alta segurança para mamíferos. Novos estudos devem ser realizados com o intuito de minimizar os efeitos colaterais e manter os níveis de eficácia do presente estudo. A aplicação do nim em uma menor concentração e um maior intervalo entre as aplicações do fitoterápico são alternativas terapêuticas que devem ser investigadas em futuros experimentos.

CAPÍTULO VI

EFICÁCIA DO NIM (*Azadirachta indica*) NO CONTROLE DE *Otodectes cynotis* (HERING, 1838) EM CÃES

RESUMO

O ácaro *Otodectes cynotis* vive na superfície da pele, sendo encontrado preferencialmente no conduto auditivo de várias espécies animais, principalmente cães e gatos, sendo a infestação denominada sarna otodécica. Esses ácaros são responsáveis por causar otite clínica, predispor ao aparecimento de otohematoma e causar alteração de comportamento. O presente trabalho foi realizado com objetivo de avaliar a eficácia do extrato aquoso de nim 10% no controle da sarna otodécica em cães naturalmente infestados. Foram utilizados dezoito animais divididos em três grupos com seis animais cada. O grupo 1 foi tratado com solução fisiológica diariamente. O grupo dois foi tratado com uma única dose do produto em teste com intervalos semanais. O grupo três foi tratado diariamente durante dez dias. Todos os animais foram examinados através de otoscopia nos dias +3, +7, +14, +21, +28 e + 35 após o tratamento. Os cães do grupo controle e do grupo tratado com a formulação em teste aplicado semanalmente apresentavam ácaros em todos os dias de observação. No grupo tratado, o percentual de eficácia do produto foi de 66,6% no dia +3 e uma eficácia de 83,3% nos demais dias de observação. Não foram observadas quaisquer reações adversas causadas pelo produto. O extrato aquoso de nim 10% apresentou baixa eficácia no controle da sarna otodécica causada por *O. cynotis* em cães naturalmente infestados.

Palavras-chave: *Otodectes cynotis*; Controle; Nim; Biopesticida

ABSTRACT

The mite *Otodectes cynotis* live on the skin surface, preferentially within the ear canal of different animal species, especially dogs and cats. This infestation is named otodectic mange. These mites are responsible for causing clinical otitis, leading to the appearance of ear hematoma and behavioral alterations. The objective of the present study was to evaluate the efficacy of a 10% neem aqueous extract on the control of otodectic mange on naturally infested dogs. Eighteen animals were divided in three groups of six animals. Group 1 was daily treated with saline (control). Group 2 was treated with the product in a single dose per week. Group 3 was treated with the product daily for 10 consecutive days. Animals were examined by otoscopy on days +3, +7, +14, +21, +28, and + 35 post-treatment. Dogs from control and the weekly treated groups presented mites throughout the days of observation. Group 3 presented an efficacy of 66.6% on day + 3 and 83.3% on other observations. No product-related adverse reactions were observed. The 10% neem aqueous extract presented low efficacy on the control of otodectic mange on naturally infested dogs.

Keywords: *Otodectes cynotis*; Control; Nim; Biopesticide

1 INTRODUÇÃO

A pele animal está exposta ao ataque de muitas espécies de parasitos, sendo responsáveis pela maior parte das alterações dermatológicas encontradas na clínica médica de pequenos animais. O ácaro *Otodectes cynotis*, pertencente à família Psoroptidae, vive na superfície da pele, sendo encontrado preferencialmente no conduto auditivo de várias espécies animais, principalmente cães e gatos, sendo a infestação denominada sarna otodécica (SWEATMAN, 1958). São ácaros grandes, brancos que apresentam intensa mobilidade. A transmissão ocorre por contato direto, e os ácaros são altamente contagiosos. O ciclo de vida se passa todo no animal durando em torno de três semanas (SCOTT et al., 2001).

Estes ácaros predisõem o animal ao aparecimento de otohematoma, e geralmente estão associados a prurido, hiperemia das orelhas e exsudação dura e escura, parecida com “borra de café” (GOTTHELF, 2000; SOUZA, 2004), produzida pela irritação das glândulas ceruminosas, podendo levar a quadros de hipersensibilidade e que pode variar de aspecto devido à infecção secundária bacteriana, fúngica ou mista (BERG; SHOMER, 1963; BAKER, 1970; KWOCHKA, 1987; LOGAS, 1994; GOMES et al., 1998; LARSSON, 1989; ANGUS, 2004; ROSSER, 2004). O diagnóstico pode ser feito através de otoscopia, visualização do cerúmen em microscópio estereoscópico ou lavado otológico (SOUZA, 2004).

O controle do parasito é realizado através da aplicação de substâncias químicas que inclui a ainda a aplicação direta nos condutos auditivos dos animais. Eventualmente, alguns animais podem demonstrar efeitos adversos quando expostos a determinados grupos farmacológicos.

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da emulsão de nim na concentração de 10%, aplicado em dose única e em doses diárias, em cães da raça Beagle, naturalmente infestados pelo ácaro *O. cynotis* em cães.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O controle do parasito tem sido realizado principalmente empregando produtos químicos com resultados satisfatórios. Akkaya e Perk (1997) relatam após empregarem o piretróide flumetrina em doses semanais em 33 gatos naturalmente infestados com *O. cynotis*. Após duas aplicações com intervalo de sete dias, três animais permaneciam positivos. Nesses animais foram realizados novos tratamentos com o dobro da dose inicial. Os animais tiveram a sarna controlada, entretanto os animais apresentaram sinais de hipersensibilidade à droga.

Em outro estudo realizado com gatos, foi utilizado fipronil 10% em duas diferentes administrações: aplicando 0,05 ml em cada pavilhão auricular e 0,4 ml na pele entre as escápulas, obtendo efeito significativo nos animais infestados até 10 dias após tratamento, e a outra forma de aplicação realizada foi instilando 0,05 ml em cada conduto auditivo e 0,4 ml na pele entre as escápulas, onde todos os animais estiveram negativos por 28 dias após tratamento (COLEMAN; ATWELL, 1999).

Em 2001, Itoh e Itoh avaliaram a eficácia do fipronil 10% na formulação “top spot” em cães parasitados com o ácaro *O. cynotis*, aplicando três gotas do produto em cada conduto auditivo, relatando uma eficácia de 93,5% de eficácia após 1 mês de tratamento. Resultados satisfatórios também foram relatados por Curtis (2004) ao empregar duas gotas de fipronil 10% em orelhas de cães e gatos no controle da otoacaríase por *O. cynotis*. No mesmo ano, Bowman et al. (2001) utilizaram com sucesso ivermectina no controle dos ácaros *O. cynotis* em gatos através de testes *in vitro*.

Shanks et al. (2000) que empregaram topicamente selamectina na dose de 6 mg/kg, em cães e gatos naturalmente infestados com 100% de eficácia no controle do parasito, aplicando o produto em dose única, ou com duas doses com intervalos mensais.

Souza et al. (2004) empregaram com sucesso o fipronil em duas formulações, “spray” e “top spot”, aplicando o produto em todo o corpo do animal, ou ainda, instilando o produto somente nos condutos auditivos. Os resultados encontrados demonstram a eficácia da formulação com apenas uma dose do produto.

Scott et al. (2005) empregaram com sucesso a associação do piretróide d-fenotrina com o inibidor de desenvolvimento de artrópodes piriproxifen, administrado em dose única, no controle de *O. cynotis* em cães naturalmente infestados. Os autores relatam eficácia de 100% a partir do dia +1 até o dia + 26.

Após a utilização de tiabendazol, um parasiticida pertencente à classe dos benzimidazóis, aplicado a cada 24 horas por um período de sete dias, foi relatado eficácia de 100% no controle da sarna otodécica em cães naturalmente infestados, não sendo observado qualquer efeito colateral (SOUZA et al., 2006a). Outro produto que demonstrou 100% de eficácia foi o organofosforado diazinon, associado pimaricina, neomicina, acetato de dexametasona, aplicados diariamente por sete dias, apresentando 100% de eficácia na eliminação dos parasitos em ambos os condutos auditivos (SOUZA et al., 2006b).

Outros grupamentos químicos não foram eficazes no controle da sarna otodécica em cães. Souza et al. (2006c) empregaram moxidectina 0,2% por via oral e por via subcutânea em animais naturalmente infestados por *O. cynotis*. No dia +4, as orelhas direita e esquerda dos cães do grupo 1 e 2 apresentaram eficácia de 16,7; 33,3; 33,3 e 0%, respectivamente, enquanto no dia +8, a eficácia foi de 16,7; 33,3; 33,3; 33,3% . Já no dia +15 foi observada eficácia de 50% em todos os condutos auditivos dos animais avaliados. No dia, +22, 50; 33,3; 33,3 e 16,7% e no dia +29 foram 16,7; 16,7; 33,3 e 33,3%, respectivamente. A moxidectina administrada uma única vez nas formulações oral e injetável, não demonstrou ser uma boa opção terapêutica no tratamento da sarna otodécica em cães.

A milbemicina na dose de dois mg/kg administrada por via oral foi utilizada como opção terapêutica no tratamento da sarna otodécica em cães. Entretanto, em todos os dias de observação, realizados nos dias +1, +4, +8, +15, +21 e + 28 após o tratamento, os animais permaneceram parasitados por *O. cynotis* (SOUZA et al., 2006d).

Os métodos de controle usualmente empregados são realizados usando acaricidas tópicos ou sistêmicos, apresentando riscos de contaminação ambiental e intoxicação do animal. Porém são em sua maioria efetivos no controle da parasitose. Até o presente momento, não foram encontrados dados na literatura sobre o uso do nim no controle da sarna otodécica. Em um trabalho de revisão, Lans et al. (2008) mencionam que algumas plantas são usadas no controle de ácaros presentes nas orelhas, tais como: *Berberis aquifolium*, *Mahonia aquifolium*, *Ricinus communis*, *Verbascum thapsus*. Porém, não menciona como foram realizados os ensaios, suas metodologias e resultados encontrados. Não foram encontradas citações na literatura consultada sobre o uso do nim (*Azadirachta indica*) para o tratamento de infestações por *O. cynotis* em cães.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliar a atividade do nim na concentração de 10%, aplicados com auxílio de um borrifador, foram utilizados dezoito cães da Raça Beagle naturalmente infestados pelo ácaro *O. cynotis* pertencentes ao Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV). Foram utilizados no ensaio apenas animais que apresentavam parasitismo em ambos os condutos auditivos, identificados como positivos através de otoscopia.

Foi utilizada a emulsão de nim, a partir do óleo de nim puro, adquirido do laboratório Natural Rural®. Para o preparo da emulsão foi acrescentado a uma parte do óleo, tween 80 (emulsificante) na concentração de 30%. Posteriormente, a solução foi levada a um agitador magnético com aquecimento, onde permanecia por 10 minutos a uma temperatura de 40° C, completando até a quantidade desejada com água.

Os animais foram divididos em três grupos de seis animais cada, mantidos em canis gramados, de forma que os animais pertencentes a cada grupo não tivessem contato com os outros animais. O grupo controle (Grupo 1) foi medicado com água destilada. O (Grupo 2) foi tratado com dois mililitros da formulação em teste contendo 10% de extrato de nim com aplicação única realizada no dia zero. Os seis animais restantes foram tratados com a mesma formulação e dosagem, aplicados diariamente por dez dias consecutivos (Grupo 3).

Foram realizadas observações diárias nos animais para verificar possíveis reações adversas causadas pelo produto. Nos dias +3, +7, +14, +21, +28 e + 35, os animais foram reexaminados através de otoscopia bilateral, realizado com auxílio de Otoscópio de fibra óptica da marca Welch Allyn. A avaliação do produto em cada orelha foi realizada através da seguinte fórmula: (número de orelhas infestadas com os ácaros vivos do grupo controle - número de orelhas infestadas com os ácaros vivos do grupo tratado) / (número de orelhas infestadas com os ácaros vivos do grupo controle) X 100. A análise estatística dos resultados será feita através do teste χ^2 corrigido (Yates) (SAMPAIO, 1998).

4 RESULTADOS E DISCUSSAO

Os cães pertencentes aos grupos controle grupo 1 - sem tratamento, e ao grupo tratado com a formulação em teste contendo 10% de extrato aquoso de nim com aplicações semanais, grupo 2, apresentaram *O. cynotis* em ambos os condutos auditivos, em todos os dias de observação, Já no grupo tratado diariamente com a formulação em teste, grupo 3, dois animais ainda permaneciam infestados com os ácaros em ambos os condutos auditivos no dia +3. No dia +7 e nos demais dias de observação, os mesmos animais continuavam a apresentar o ácaro *O. cynotis* em apenas um conduto (Tabela 1).

Como cada orelha corresponde a uma amostra independente, observa-se no grupo tratado diariamente com o produto em teste uma eficácia de 66,6% no dia +3 e uma eficácia de 83,3% nos demais dias de observação (Tabela 2). Não foram observadas reações adversas relacionadas ao tratamento nos animais durante todo período experimental. Até o presente momento não foram encontrados citações na literatura sobre a utilização de extratos de nim no controle da sarna otodécica causada por *O. cynotis*.

Tabela 1. Resultado da otoscopia realizada nos animais naturalmente infestados com o ácaro *Otodectes cynotis* divididos em três grupos com seis animais cada.

Grupos/ Animais	Presença de ácaros vivos por dias de desafio													
	Dia 0		Dia +3		Dia + 7		Dia +14		Dia + 21		Dia + 28		Dia + 35	
	OD ¹	OE ²	OD	OE	OD	OE	OD	OE	OD	OE	OD	OE	OD	OE
Controle														
01	+ ³	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
02	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
03	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
06	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nim 10%														
DU														
07	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
08	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
09	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nim 10%														
DD														
13	+	+	- ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
16	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
17	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1 - Orelha direita; 2 – Orelha esquerda; 3 – Orelha contendo ácaros vivos; 4 – Orelhas sem ácaros; DU – Dose única; DD- Dose diária.

Tabela 2. Orelhas não tratadas e tratadas com extrato aquoso de nim a 10% ao fim da avaliação para infestação por *Otodectes cynotis*.

Grupos	Diagnóstico ao final da experimentação		
	Positivos	Negativos	Total
Controle	12	0	12
Nim 10% dose única	12	0	12
Nim 10% dose diária	2	10	12

Akkaya e Perk (1997) relatam uma eficácia superior ao presente estudo ao empregarem o piretróide flumetrina em doses semanais em 33 gatos naturalmente infestados por *O. cynotis*. Após duas aplicações com intervalo de sete dias, três animais permaneciam positivos. Nesses animais foram realizados novos tratamentos com o dobro da dose inicial. Os animais tiveram a sarna controlada, entretanto os animais apresentaram sinais de hipersensibilidade à droga.

Os resultados do presente estudo são inferiores aos descritos por Shanks et al. (2000) que empregaram topicamente selamectina em cães e gatos naturalmente infestados com 100% de eficácia no controle do parasito. Já Itoh e Itoh em (2001) relatam a eficácia de 93,5% ao utilizarem fipronil no controle da sarna otodécica em cães naturalmente infestados resultado superior ao presente estudo.

Scott et al. (2005) relataram a eficácia superior ao presente estudo no controle da sarna otodécica em cães naturalmente infestados ao utilizarem o piretróide d-fenotrina em dose única. Os resultados relatados por Souza et al. (2004) que empregaram fipronil em dois métodos de aplicação distintos, também são superiores ao presente estudo.

Outras drogas também foram descritas como sendo eficazes no controle de *O. cynotis* com resultados superiores aos descritos no presente trabalho. Souza et al. (2006a) relatam resultados superiores ao presente estudo após a utilização do benzimidazol, tiabendazol, no controle dos ácaros presentes nos condutos auditivos de cães naturalmente infestados. Assim como, Souza et al. (2006b) que relatam eficácia de 100% no controle da sarna otodécica em cães após utilizarem o diazinon.

Os resultados relatados do presente trabalho são superiores aos relatados por Souza et al. (2006c) que após a utilização da moxidectina, apresentou uma eficácia de apenas 33,3% no final do período experimental. Mesmo utilizando um tratamento sistêmico, os resultados do trabalho de Souza et al. (2006d) são inferiores ao presente estudo, pois a milbemicina, utilizada por via oral em dose única, não apresentou eficácia no tratamento da sarna otodécica.

Novos estudos devem ser realizados com o intuito de aumentar a eficácia do extrato da planta *A. indica* no controle da sarna otodécica. Embora alguns casos tenham sido refratários ao tratamento diário, o controle da parasitose usando extrato de nim é uma nova opção como tratamento, por apresentar, relativamente, baixo custo aos proprietários e o fato dos animais do estudo não manifestarem reações adversas ao produto.

CAPÍTULO VII

EFICÁCIA DO NIM (*Azadirachta indica*) NO CONTROLE DE *Sarcoptes scabiei* var. *canis* (DE GEER, 1778) EM CÃES

RESUMO

Sarcoptes scabiei var. *canis* é um dos ectoparasitos de maior prevalência e importância veterinária por determinar intenso prurido e ser uma doença debilitante. A escabiose canina não possui predileção por raça, sexo ou idade, mas está relacionada principalmente a condições precárias de higiene associadas à aglomeração dos animais. Diversas opções terapêuticas são relatadas na literatura. Entretanto, produtos 100% eficazes isentos de reações adversas ainda não são encontrados. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a eficácia do extrato aquoso de nim (*Azadirachta indica*) 10% no controle da sarna sarcóptica em cães naturalmente infestados. Foram utilizados 18 animais divididos em três grupos com seis animais cada. O grupo 1 permaneceu sem tratamento, grupo controle. O grupo 2 recebeu tratamento com a formulação teste em intervalos semanais por um período de sessenta dias. O grupo 3 foi medicado com o mesmo produto diariamente pelo mesmo período. Os animais foram avaliados diariamente para acompanhamento de eventuais efeitos colaterais ao produto. A avaliação da eficácia foi realizada nos dias +7, +14, +21, +28, +35, +42, +49, +56 e +63 após o tratamento. Os cães do grupo controle apresentaram ácaros vivos em todos os dias de observação. Já no grupo tratado semanalmente foi observado uma eficácia de 83,3% a partir do dia +7. No grupo tratado diariamente, a eficácia observada ao longo do período experimental foi de 100%. Em todos os animais tratados houve melhora clínica das lesões. Nenhum animal apresentou efeito colateral ao produto.

Palavras chave: *Sarcoptes scabiei*; Controle; Nim; Biopesticidas

ABSTRACT

Sarcoptes scabiei var. *canis* is one of the ectoparasites of higher prevalence and veterinary concern because determinates intense pruritus and be a debilitating disease. Canine scabiosis does not have predilection for breed, gender or age. However, is mainly related to poor hygienic conditions associated with dogs overcrowding. Various therapeutical options are reported in the literature. Though, 100% efficacious products free of adverse reactions are not known yet. The objective of the present study was to evaluate the efficacy of a 10% neem (*Azadirachta indica*) aqueous extract on the control of sarcoptic mange on naturally infested dogs. Eighteen crossbreed animals were divided in three groups of six animals. Group 1 was maintained untreated (control). Group 2 was weekly treated with the tested formulation, within a period of 60 days. Group 3 was treated with the same product, daily for the same period. Animals were evaluated daily for product-related side effects. Efficacy was evaluated on days +7, +14, +21, +28, + 35, +42, +49, +56 and +63 post-treatment. Dogs from control group presented with living mites throughout the days of observation. While the weekly treated group had a 83.3% efficacy, from day +7 onwards. The daily treated group presented 100% efficacy throughout the trial. Treated animals showed clinical recovery of lesions and did not presented product-related side effects.

Keywords: *Sarcoptes scabiei*; Control; Neem; Biopesticide

1 INTRODUÇÃO

Relacionado às condições de higiene e sanidade do local onde são mantidos os animais domésticos (WALTON, et al., 2004) está o ácaro *Sarcoptes scabiei* var. *canis*, que é altamente contagioso, seja de forma direta ou através de fômites, é responsável por uma das doenças cutâneas de maior desconforto, causando intenso prurido ao hospedeiro. A lesão caracteriza-se pelo aparecimento de pequenas pápulas esbranquiçadas ou eritematosas que se localizam, inicialmente, nas regiões inguinais, axilares e bordos das orelhas. Vesículas também podem ser visualizadas no início do processo, mas logo resultam em áreas de alopecia, hiperqueratose, formação de crostas e possibilitar infecções bacterianas secundárias ao ácaro, sendo debilitante ao animal (CURTIS, 1996; FOURIE et al., 2007).

Acomete principalmente cães, mas pode ser encontrado em raposas, gatos, e nos seres humanos que estão diretamente em contato com os animais parasitados (SHANKS et al., 2000; SIX et al., 2000; MATOUSEK, 2004). Estima-se que cerca de 300 milhões de pessoas são afetadas por essa doença (WHO, 2001).

O ciclo de vida deste parasito dura em torno de três semanas e apresenta as fases de ovo, larva, ninfa e adulto. Após a cópula, a fêmea escava galerias onde coloca de um a três ovos por dia, levando cerca de dez dias para eclosão. Podem ser encontrados ácaros fora dos hospedeiros por semanas, entretanto eles são contagiosos por apenas 36 horas (ABDEL-GHAFFAR, 2008).

O diagnóstico é feito através de raspados cutâneos, uma vez que o ácaro é encontrado na epiderme do hospedeiro. No entanto, existem estudos que indicam que 50% dos casos positivos não são identificados através desta técnica (MATOUSEK, 2004).

Diversos protocolos terapêuticos têm sido descritos na literatura apresentando bons resultados. Esses protocolos incluem o uso de medicações consideradas tóxicas aos animais que podem ser empregadas em diferentes vias de administração, seja por via oral, injetável ou tópica. Nos casos mais graves da doença causada pelo ácaro, a forma generalizada, frequentemente é possível encontrar lesões ulceradas o que pode aumentar a absorção do medicamento e levar o animal ao quadro de intoxicação.

Sendo assim, o desenvolvimento de produtos biopesticidas se faz necessário na busca de novas moléculas com eficácia no controle dos parasitos, que apresentem menor possibilidade de desenvolver reações adversas.

O objetivo do trabalho foi avaliar a eficácia do nim, no controle do ácaro *S. scabiei*, aplicados semanalmente ou em dose única em cães naturalmente infestados apresentando a forma generalizada da doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Koutinas et al. (2001) relatam que não existe nenhum medicamento disponível no mercado que apresente eficácia de 100% e que seja isento de reações adversas. Ainda hoje a ivermectina é considerada a droga de eleição no controle do parasito, devido ao seu preço, eficácia e praticidade do tratamento. Entretanto, ela é contra-indicada em cães com idade inferior a dezesseis semanas e em algumas raças de cães. A milbemicina é uma opção terapêutica, mas apresenta eficácia inferior (MILLER et al., 1996; SHIPSTONE et al., 1997).

Moxidectina apresentou eficácia em doze animais naturalmente infestados com *S. scabiei*, porém, dois animais apresentaram reações adversas ao produto (WENDELBERGER; WAGNER, 1998). Shanks et al. (2000) recomendam a utilização de selamectina no controle da sarna sarcóptica por apresentar eficácia no controle da parasitose, entretanto, deve-se utilizar apenas em animais com idade superior a seis semanas. Scott et al. (2005) utilizaram com sucesso a associação do piretróide d-fenotrina com o inibidor de desenvolvimento de artrópodes piriproxifen no controle de cães naturalmente infestados por *S. scabiei*.

A eficácia do fipronil foi testada por Koutinas et al. (2001) em doze animais severamente acometidos por escabiose. Os autores empregaram o fipronil na apresentação spray, administrando o produto durante trinta dias com intervalos semanais. Ao final do período experimental, todos os animais apresentavam-se negativos através de raspados cutâneos, com melhora clínica das lesões provocadas pelos ácaros.

Na tentativa de minimizar o uso de produtos químicos, muitas vezes deletérios aos animais, a associação com produtos fitoterápicos pode representar uma alternativa no controle dos parasitos, diminuindo a dose ou o tempo de aplicação dos produtos convencionais.

Hirudkar et al. (1997) empregando óleo de nim a 50% em ovelhas naturalmente infestadas por *S. scabiei* obtiveram eficácia de 87,7% após 30 dias de emprego do produto. Já em 2000, Walton et al., utilizaram através de teste *in vitro* extratos de nim a 0,3 e 0,5% no controle de *S. scabiei* var. *hominis* não obtendo eficácia no controle dos parasitos.

Kumar et al. (2005) empregaram com sucesso a associação de produtos fitoterápicos, dentre eles o nim, no controle da sarna sarcóptica em porcos. Os resultados revelaram que não houve diferença significativa entre o grupo tratado com a formulação em teste e o grupo controle positivo, que foi tratado com ivermectina, onde obtiveram 100% de eficácia após o dia + 13.

Tabassam et al. (2008) empregaram formulações contendo óleo de nim a 10 e 20% associados ou não ao metanol, na formulação de pomada, no controle da sarna causada pelo ácaro *S. scabiei* em ovinos naturalmente infestados. Foram realizados sete tratamentos, em dias alternados, onde o produto foi aplicado nas lesões. À medida que novos tratamentos eram realizados, os sinais clínicos sofriam regressão. Ao longo de todo período experimental, a formulação contendo 20% de nim associado ao metanol foi a única que apresentou 100% de eficácia, sendo este efeito notado a partir do dia +16. Ao longo dos vinte e dois dias de experimentação, a eficácia da formulação com 10% de nim, com ou sem metanol foi de 91,91% e 87,12% respectivamente.

A eficácia do óleo de nim também já foi descrita em coelhos naturalmente infestados com *S. scabiei*. Du et al. (2008) empregaram diferentes diluições no controle de larvas do ácaro através de testes *in vitro*. Após separação e observação da eficácia realizada ao microscópio estereoscópico, os resultados demonstraram que nos ácaros em que foram usadas as maiores concentrações, a morte ocorria de maneira mais rápida, embora no final de 24 horas, todas as larvas de *S. scabiei* estavam mortas.

A eficácia do nim no controle da escabiose canina foi testada por Abdel-Ghaffar et al. (2008), onde foi empregado através de banhos com xampu a base de Nim por quatorze dias consecutivos. Após sete dias de uso, quatro animais dos dez naturalmente infestados utilizados na experimentação estavam livres do parasitismo, constatado a partir de raspados negativos e da melhora clínica dos animais. Os demais animais estavam clinicamente melhores, entretanto, ainda era possível identificar a presença dos ácaros. Ao final do período experimental, apenas dois animais continuavam a apresentar ácaros, embora as lesões já se apresentassem em final de processo cicatricial. Apesar do trabalho em administrar a droga através de banhos, expondo o animal diariamente em contato com o produto, nenhum animal apresentou efeito colateral.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliação da eficácia do nim no controle da sarna sarcóptica foram utilizados 18 animais, SRD, de idades variadas, oriundos de um abrigo localizado no município do Rio de Janeiro, sendo identificados como naturalmente infestados pelos ácaros através de raspados cutâneos de seis regiões distintas: bordas das orelhas direita e esquerda, cotovelos direito e esquerdo, base da cauda e região ventral do animal, observados posteriormente ao microscópio.

Foi utilizada a emulsão de nim, a partir do óleo de nim puro, adquirido do laboratório Natural Rural®. Para o preparo da emulsão foi acrescentado a uma parte do óleo, tween 80 (emulsificante) na concentração de 30%. Posteriormente, a solução foi levada a um agitador magnético com aquecimento, onde permanecia por 10 minutos a uma temperatura de 40° C, completando até a quantidade desejada com água.

Os animais foram divididos em três grupos com seis animais cada: Grupo 1 foi mantido sem tratamento, grupo controle. O grupo 2 foi tratado com a formulação em teste, contendo 10% de nim, aplicados com auxílio de um borrifador, sendo empregado a cada sete dias, por um período de sessenta dias de experimentação. O grupo 3 foi tratado com a mesma formulação aplicando o produto diariamente por um período de trinta dias. Em ambos os grupos tratados, os animais foram medicados de maneira que todas as regiões do corpo fossem banhadas, sendo aplicado a dose de 3ml/kg de peso vivo.

Os animais de cada grupo experimental foram mantidos em canis cimentados, de maneira que os animais de cada não tivessem contato entre si. Os animais foram mantidos com água *ad libitum* e comida sendo oferecida apenas uma vez ao dia.

Os animais eram avaliados diariamente para o acompanhamento de possíveis reações adversas do produto, bem como para o acompanhamento da evolução clínica dos animais. Para avaliação da eficácia, foram realizados raspados cutâneos nos dias 0, +7, +14, +21, +28, +35, +42, +49, +56 e +63, das mesmas regiões, onde a mobilidade do ácaro era o parâmetro para analisar sua viabilidade. Para avaliação da eficácia foram utilizadas como parâmetros a evolução clínica dos animais tratados, além da fórmula: $(n^\circ \text{ de positivos antes do tratamento} - n^\circ \text{ de positivos depois do tratamento}) / (n^\circ \text{ de positivos antes do tratamento}) \times 100$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os animais utilizados no experimento estavam naturalmente infestados por *S. scabiei*. Todos os animais apresentavam lesões generalizadas causadas pelos ácaros, principalmente ao redor das orelhas e nos cotovelos. Secundariamente, os animais apresentavam alopecia, pápulas e sinais de infecção bacteriana secundária (Figura 1).

O tratamento com a formulação em teste contendo 10% de nim, aplicados diariamente ou semanalmente apresentou eficácia no tratamento, promoveu uma recuperação dos sinais clínicos nos animais tratados, além de não apresentar nenhum efeito colateral após a aplicação do produto nos animais. Já no grupo controle, todos os animais continuaram a apresentar raspados positivos de pelo menos uma área de onde foi feito o exame do animal, conforme descrito na metodologia. A tabela 1 mostra o resultado dos raspados cutâneos nos diferentes grupos experimentais, antes e após o tratamento.

Apenas um animal do grupo tratado com a formulação contendo 10% de nim, com aplicações semanais, continuou a apresentar ácaros vivos identificados em pelo menos um local do raspado, representando uma eficácia de 83,3%.

Porém, no dia +35, outro animal do mesmo grupo apresentou raspado positivo, totalizando dois animais positivos de um total de seis animais. O raspado desse animal acusou apenas um ácaro de uma lesão em fase de cicatrização, não sendo achado outro ácaro nos demais locais do raspado cutâneo.

Todos os animais do grupo tratado semanalmente apresentaram melhora clínica das lesões causadas pelo ácaro (Figura 2), inclusive o animal refratário ao tratamento com a formulação em teste, que apresentou um menor número de ácaros nos raspados cutâneos. Possivelmente, a razão pela qual o animal continuou a apresentar ácaros no raspado se deve a alta carga parasitária inicial associada ao caráter generalizado das lesões.



Figura 1. Animal naturalmente infestado por *Sarcoptes scabiei* pertencente ao grupo controle no dia 0. Notar o caráter disseminado da doença.

Tabela 1. Resultado dos raspados cutâneos dos cães naturalmente infestados com o ácaro *Sarcoptes scabiei* nos diferentes dias e grupos experimentais.

Grupos/ Animais	Presença de ácaros por dia de desafio									
	0	+7	+14	+21	+28	+35	+42	+49	+56	+63
Controle	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nim 10% SE										
7	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
8	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nim 10% DI										
13	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
16	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Nim SE – Nim 10% de aplicação semanal. Nim DD – Nim 10% de aplicação diária

No grupo onde foi aplicado diariamente o produto em teste, foi observado eficácia de 100% já no dia + 7. Apenas no dia + 42, um animal apresentou um ácaro no raspado realizado da borda da orelha. Já no dia + 49, não foram encontrados mais ácaros. A recuperação clínica dos animais tratados diariamente seguiu o padrão observado para o tratamento semanal, com as lesões apresentando processo de cicatrização mais acentuado (Figura 3).

Todos os animais tratados participantes do experimento apresentavam melhora no quadro clínico quando comparado aos animais do grupo controle e aos próprios animais no dia zero. Esses resultados podem ser creditados ao efeito acaricida da formulação, mas também pelas propriedades anti-inflamatórias e antibacterianas da planta *A. indica*, já relatadas na literatura. Devido ao estágio evoluído das lesões em alguns animais dos grupos tratados, mesmo apresentando significativa melhora clínica, alguns animais continuavam a apresentar lesões dermatológicas como alopecia, hiperpigmentação e formação de crostas. Esses achados podem não ser encontrados em animais que sejam manejados de forma correta. Os animais utilizados no presente estudo eram oriundos de um abrigo que mantinha os animais em condições precárias de higiene e saúde (Figura 4).

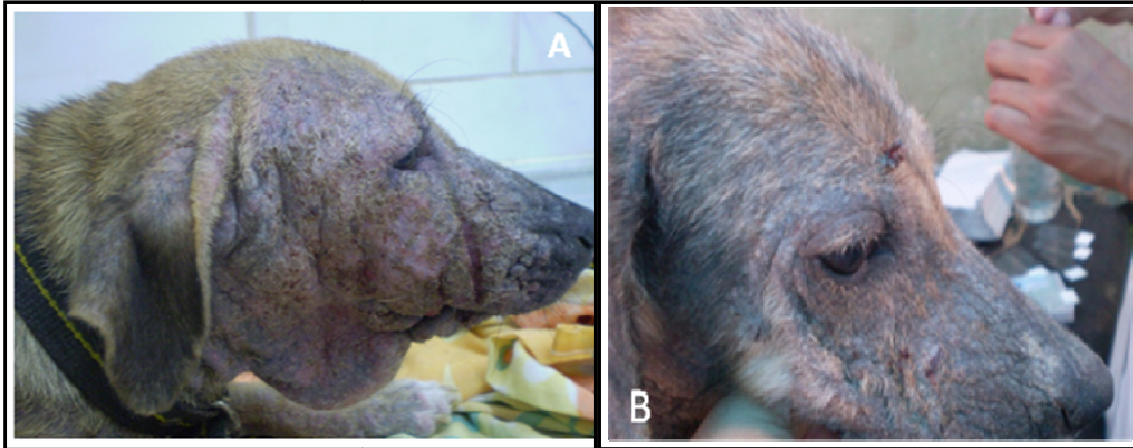


Figura 2. Animal pertencente ao grupo tratado com a formulação contendo 10% de extrato aquoso de nim tratado semanalmente. Notar as lesões dermatológicas no dia do zero (A) e no dia +63 (B).



Figura 3. Animal pertencente ao grupo tratado com a formulação contendo 10% de extrato aquoso de nim tratado diariamente. Notar as lesões dermatológicas no dia do zero (A) e no dia +63 (B).



Figura 4. Ambiente do abrigo onde eram mantidos os animais utilizados na experimentação.

Normalmente os animais eram alimentados com rações de qualidade ruim e em quantidades diárias insuficientes. Para o desenvolvimento do pêlo apresentar níveis de crescimento normais é necessária alimentação correta e balanceada, cuidados estes que não foram tomados no presente estudo, sendo um dos principais fatores responsáveis pelo longo período de recuperação dos animais.

Proporcionalmente, os resultados do presente estudo são superiores aos relatados por Hirudkar et al. (1997) ao utilizarem óleo de nim na concentração de 50% em ovinos infestados com *S. scabiei* obtendo eficácia de 87,7% após trinta dias de experimentação. Em 2000, Walton et al., relatam resultados inferiores ao presente estudo ao utilizarem através de teste *in vitro* extratos de nim a 0,3 e 0,5% no controle de *S. scabiei* var. *hominis* não obtendo eficácia no controle dos parasitos. Já Kumar et al. (2005) relatam eficácia superior ao presente trabalho ao utilizarem extratos de plantas, sendo uma delas nim em porcos parasitados com o mesmo ácaro, obtendo 100% de eficácia com apenas 13 dias. Du, et al. (2008) relatam em seu trabalho uma eficácia superior ao presente estudo ao empregarem extrato oleoso de nim em larvas de *S. scabiei* var. *cuniculi* em teste *in vitro* obtendo 100% de eficácia após vinte e quatro horas.

As comparações entre os trabalhos muitas vezes são realizadas observando os resultados finais relatados pelos autores, uma vez que diferentes formulações, fases parasitárias utilizadas nos ensaios, metodologias e sua forma de administração nas espécies dificultam a interpretação e comparação dos resultados.

O trabalho desenvolvido por Abdel-Ghaffar et al. (2008) é o que apresenta metodologia mais próxima ao do presente estudo, porém a concentração do fitoterápico, modo de aplicação e sobretudo os animais utilizados são completamente distintos. Os autores utilizaram extratos de nim na forma de xampu em quatorze cães naturalmente infestados com o ácaro *S. scabiei*, com lesões localizadas principalmente nas bordas das orelhas. Os autores relatam 100% de eficácia já no dia +7 em dez animais, subindo para doze animais no dia +14, uma vez que apenas dois animais continuavam a apresentar ácaros nos raspados cutâneos, embora em uma quantidade menor ao dia do tratamento.

Os autores relatam ainda que todos os animais apresentavam-se clinicamente melhores, com remissão das alterações dermatológicas, alterações inflamatórias e crescimento dos pêlos. Os animais em ambos os estudos apresentaram-se clinicamente melhores quando comparados ao início do tratamento, embora os resultados do presente estudo tenham levado muito mais tempo para obter uma resposta similar. Este aspecto pode ser devido aos animais apresentarem lesões localizadas e terem proprietários, o que possibilitou um manejo adequado dos animais.

Os resultados do presente estudo confirmam a eficácia do nim na concentração de 10%, sendo segura sua utilização, mesmo nos casos generalizados da escabiose canina, com o emprego diário do produto apresentando melhores resultados. Eventualmente, caso as condições dos animais no abrigo fossem melhores, possivelmente os resultados clínicos seriam superiores aos observados.

CAPÍTULO VIII

EFICÁCIA DO NIM (*Azadirachta indica*) NO CONTROLE DE *Notoedres cati* (HERING, 1838) (ACARI: SARCOPTIDAE) EM GATOS

RESUMO

Notoedres cati é um ácaro responsável por uma doença parasitária não sazonal da pele de gatos, que eventualmente pode acometer outras espécies de animais, incluindo o homem. Localiza-se principalmente nas orelhas e na cabeça dos felinos, sendo encontrado ocasionalmente em todo o animal. O parasitismo pode ser assintomático a severo, caracterizado por alopecia, pápulas, hiperemia e crostas que acabam resultando em intenso prurido, infecções secundárias. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a eficácia do extrato aquoso de nim 10% no controle da sarna notoédrica em gatos naturalmente infestados. Foram utilizados 18 animais, SRD, de idades variadas, naturalmente infestados pelos ácaros, sendo identificados através de raspados cutâneos, de três regiões distintas: bordas das orelhas direitas e esquerdas, região da face. Os animais foram divididos em três grupos com seis animais cada. Grupo 1 foi mantido sem tratamento, grupo controle. O grupo 2 foi tratado com a formulação em teste, contendo 10% de nim, aplicados na formulação *spray*, sendo empregado a cada sete dias, por um período de trinta dias de experimentação. O grupo 3 foi tratado com a mesma formulação aplicando o produto diariamente por igual período. Para cálculo da eficácia, foram realizados raspados cutâneos nos mesmos locais, nos dias +3, +7, +14, +21, +28, + 35 e + 42 após o tratamento. Os gatos do grupo controle apresentavam ácaros vivos em todos os dias de observação. Em ambos os grupos tratados, não foram vistos mais ácaros vivos já a partir do dia +7. A remissão completa das lesões foi observada após sessenta dias de aplicação do produto. Devido ao hábito peculiar do gato em se lambar, alguns animais dos grupos tratados apresentaram sialorréia transitório após a aplicação do produto.

Palavras-chave: *Notoedres cati*; Controle; Nim; Biopesticidas

ABSTRACT

Notoedres cati is a mite responsible for causing a parasitic disease in cats' skin, eventually infesting other animal species, including men. It occurs mainly on ears and head, and occasionally can be generalized. The parasitism can be asymptomatic to severe, characterized by alopecia, papules, hyperaemia and crusts leading to intense pruritus and secondary infections. The objective of the present study was to evaluate the efficacy of a 10% neem aqueous extract on the control of notoedric mange on naturally infested cats, diagnosed by skin scrapings from three different regions: right and left ears and face. Eighteen crossbreed animals were divided in three groups of six animals. Group 1 was maintained untreated (control). Group 2 was weekly treated with the tested formulation for a period of 30 days. Group 3 was treated with the same product for consecutive days, during the same time. Efficacy was calculated based on the results of skin scrapings from the same regions made on days +3, +7, +14, +21, +28, + 35 and + 42 post-treatment. Cats from control group presented with living mites throughout the days of observation. Living mites were not observed on both treated group from day +7 onwards. Complete recovery of lesions was observed at the end of the trial. Some cats presented intense transitory sialorrhea caused by ingestion of small quantity of the product because of self-grooming.

Keywords: *Notoedres cati*; Control; Neem; Biopesticide

1 INTRODUÇÃO

A pele animal está exposta ao ataque de muitas espécies de parasitos, sendo responsáveis pela maior parte das alterações dermatológicas encontradas na clínica médica de pequenos animais. Com aspecto muito semelhante ao gênero *Sarcoptes*, os ácaros causadores da sarna notoédrica, *Notoedres cati*, é altamente contagiosa, localizando-se principalmente nas orelhas e na cabeça de felinos, porém em casos de altas infestações possa ser encontrada em qualquer região do animal, sobretudo em torno dos órgãos genitais. Ocasionalmente ocorre envolvimento generalizado.

O ácaro também pode infestar cães e pode causar lesões transitórias nos seres humanos em contato com os animais infestados. Sua importância está relacionada principalmente as condições ambientais e higiênicas dos animais, passando de parasitismo eventual (BEUGNET, 2004), bem como graves alterações dermatológicas caracterizadas por alopecia, pápulas, hiperemia e crostas que acabam resultando em intenso prurido, infecções secundárias, levando o animal a escoriações por arranhaduras (SOUSA, 1995; URQUART et al., 1996; FRIBERG, 2006; SERRA-FREIRE; MELLO, 2006). Nos casos crônicos e graves, os animais podem apresentar anorexia, depressão, emaciação e linfadenopatia periférica.

Estudos recentes demonstram que durante o comportamento das fêmeas em escavar galerias na camada córnea da epiderme ocorre lesão em queratinócitos e liberação de citocinas, interleucina -1, causando inflamação (FRIBERG, 2006).

Apesar de ser uma doença altamente contagiosa, o número de casos e consequentemente o número de publicações referentes ao parasitismo causado pelo ácaro *N. cati* vem diminuindo, possivelmente pelo uso de substâncias químicas utilizadas no controle, pois são moléculas que apresentam baixo custo e praticidade na aplicação (ITOH, et al, 2004; RATAJ et al., 2004).

O controle é feito utilizando produtos químicos que eventualmente podem levar os animais a quadros de intoxicação. O objetivo do trabalho foi avaliar a eficácia da emulsão de nim no controle de *N. cati* em gatos naturalmente infestados.